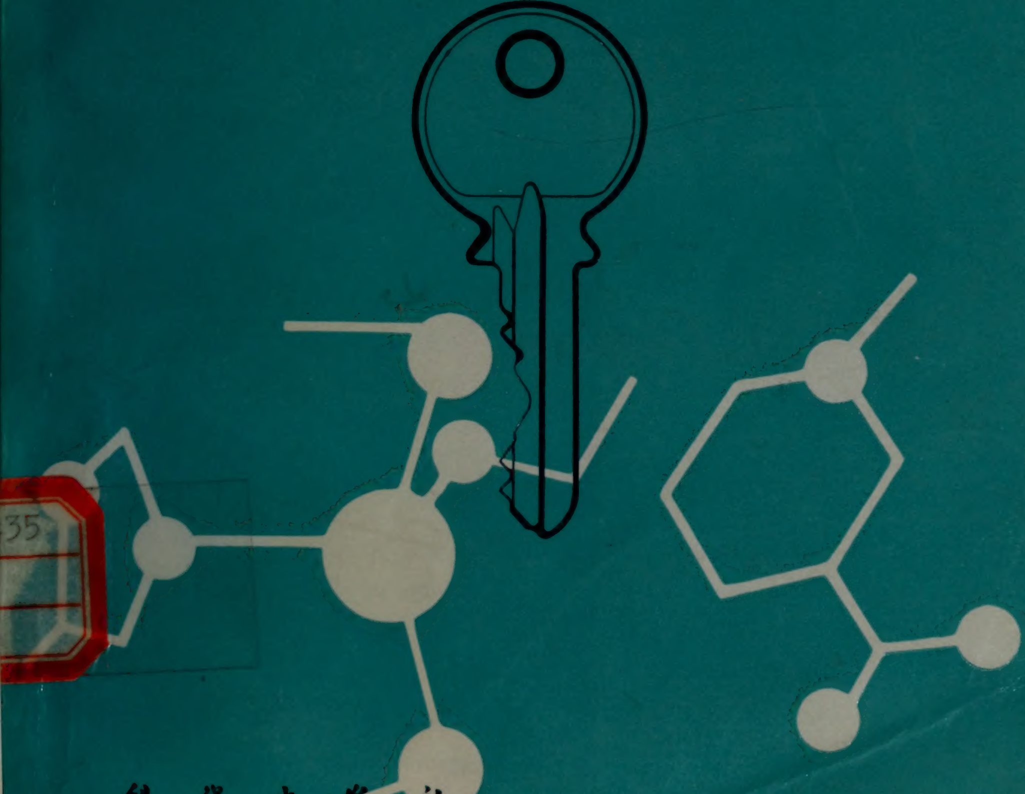
酶化学

影响与应用

〔英〕C. J. 萨克林 主编



35

科学出版社

58.17435
794

酶化学

影响与应用

〔英〕C. J. 萨克林 主编

金道森 童林荟
姚钟麒 吴应文 译

中国科学院植物研究所图书馆藏

科学出版社

1991

25851
中科院植物所图书馆
S0014761

(京) 新登字 092 号

内 容 简 介

酶化学作为生物化学的主要组成领域之一，处在化学和生物学的边缘，历来受到多学科学者的关注。本书由不同专长的作者分章执笔，介绍了30年来酶化学对一些重要化学领域的影响和应用，包括酶催化机理基础、辅酶模型、反应选择性、生原合成、药物合理设计、生物体中金属离子等。最后论述酶学对生物化学及相关学科的影响。本书内容丰富生动，视野开阔，选材颇具匠心，不仅阐述有关领域概貌和研究成果，而且分析、讨论了研究思想及问题症结等，富有启发性。

本书可供生物有机、有机合成、生物催化、天然产物化学、药物设计，以及生物技术等方面教学、科研和生产工作者参考或作为研究生教材。

C. J. Suckling Ed.
ENZYME CHEMISTRY
Impact and Applications
Chapman and Hall, 1984

酶 化 学
影响与应用
〔英〕C. J. 萨克林 主编
金道森 童林荟 姚钟麒 吴应文 译
责任编辑 杨淑兰
科学出版社 出版
北京东黄城根北街16号
邮政编码：100707
中国科学院印刷厂印刷
新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售
*
1991年12月第一版 开本：850×1168 1/32
1991年12月第一次印刷 印张：8 3/4
印数：0001—2 300 字数：228 000
ISBN 7-03-002466-4/O·460
定价：9.90 元

译 者 序

当前,生命科学正处在大综合大发展的时期,生物学将成为自然科学的领头学科. 各学科间双向渗透,相互促进,同时引起许多边缘学科的蓬勃发展. 本世纪以来, 在化学与生物学之间的接触地带先后形成了生物化学、生物技术、生物有机、生物无机以及仿生化学等. 其中生物化学占据从物理科学到生物科学谱系的中心位置,而酶化学又是它的主要组成分支. 在某种意义上,生物化学可看作一种集成酶学.

酶鲜明地体现了生物体系的识别、催化、调节等奇妙功能. 酶研究不仅深刻影响生物化学以至整个生物学领域, 而且刺激了许多化学研究, 成为灵感的源泉. 酶及其模拟体系应用于实验室规模有机合成以及工业上药物、农业化学品和精细化工产品的生产,有许多优点;在快速和高选择性、高灵敏度的分析上也极有用. 至于联系到再生性资源、能源、环境保护等一些较远期的根本性重大问题,也有引人入胜的前景. 化学与生物技术结合,有可能焕发出勃勃生机.

本书介绍 30 年来酶化学研究对几个重要化学领域,特别是关系到有机合成和生物有机化学方面的影响和应用, 并有一章论述酶学对生物化学及相关学科的影响. 不仅阐述重要研究成果和现状,而且夹叙夹议,讨论一些基础概念、方法、研究思想、发展源流和前景预测,很有启发性.

本书第三章由童林荟翻译, 第六章由姚钟麒翻译, 第八章由吴应文翻译, 其余由金道森翻译并整理全稿. 由于内容涉及面很宽, 有些词的译法不便统一, 有些新词尚未见到中译名, 原文个别地方比较晦涩或存在其它问题, 翻译较费力, 虽仔细推敲, 仍不尽惬意. 加之限于水平,不妥之处谅必难免,诚挚地请读者批评

指正。

译 者

1989年11月于兰州

序　　言

在分子科学中，酶化学作为化学和生物学两学科之间主要接触点之一，占有特殊位置。酶是具有选择性的有效的催化剂，这些特殊性质在现今化学家面临的挑战中是特别重要的，在过去 30 年间，酶化学的发展对化学研究已经起了重要的促进作用。在酶的内在性质的研究，以及它们在合成、药物设计和生物合成上的应用方面，已产生巨大影响。本书将几篇描述这些领域的论文汇集于一册，侧重于应用。在序言中概述本书的思路和内容可能是不必要的重复，因为开始的一章比序言更能雄辩地说明这一点，因此建议读者从第一章开始阅读。而在此我愿诚挚地感谢对完成本书作出贡献的各位作者，承他们接受本书总的设想和细心撰写；感谢皇家学会会员 Charles Suckling 博士和 Hamish Wood教授对全书的建设性批评；以及 Chapman and Hall 出版公司的 John Buckingham 博士和他的同事们在将打字稿变为本书的工作中所表现出的效率和热忱。

C. J. 萨克林

University of Strathclyde

目　录

译者序
序言
第一章　初期的酶化学………………………………………… 1
第二章　酶催化的机理基础………………………………… 8
2.1　引言 ……………………………………………………… 8
2.2　催化作用的一些概念 ………………………………… 9
2.3　机理的描述 ……………………………………………… 9
2.4　熵与酶催化 ……………………………………………… 18
2.5　质子转移和催化作用 ………………………………… 22
2.6　酶的效率 ………………………………………………… 24
2.7　分子内催化的例子 …………………………………… 26
2.8　过渡态类似体 …………………………………………… 29
2.9　多重结合位点 …………………………………………… 33
2.10　仿生化学 ………………………………………………… 34
2.11　展望将来 ………………………………………………… 37
第三章　辅酶催化的化学模型……………………………… 39
3.1　引言 ……………………………………………………… 39
3.2　辅酶烟酰胺的模型研究 ……………………………… 40
3.3　黄素的催化作用 ……………………………………… 52
3.4　与维生素 B_1 及其类似物有关的催化反应………… 61
3.5　吡哆醛的催化作用 …………………………………… 66
3.6　硫醇辅酶的催化作用 ………………………………… 71
3.7　结束语 …………………………………………………… 74
第四章　合成中的选择性——化学法或酶法…………… 75
4.1　引言 ……………………………………………………… 75

4.2 解决了的问题 …………………………………………… 78
4.3 酶和微生物在合成上应用的逻辑和类比 ………… 83
4.4 “竞争”中的酶和化学试剂 ……………………………… 87
4.5 后阶段官能团的修饰 ………………………………… 95
4.6 合成中的仿生化学 …………………………………… 99
4.7 结束语 ……………………………………………………… 114
第五章 酶作为药物设计的靶垛 ……………………………… 115
5.1 引言 ……………………………………………………… 115
5.2 药物发现的案例研究 …………………………………… 117
5.3 最近的发展及其在抑制剂设计中的应用 ………… 152
第六章 生物体系中的金属离子 ……………………………… 158
6.1 引言和一般化学原理 …………………………………… 158
6.2 过渡金属元素：(1)铁和铜 ……………………………… 163
6.3 过渡金属元素：(2)其它金属 …………………………… 174
6.4 主族元素：钠、钾、镁和钙 ……………………………… 180
6.5 用作药物的金属离子：金和锂 ………………………… 182
6.6 现代物理方法 …………………………………………… 186
6.7 结束语 ……………………………………………………… 190
第七章 天然产物生物合成在酶水平上的研究 ……………… 193
7.1 引言 ……………………………………………………… 193
7.2 应用无细胞体系的最新进展 …………………………… 196
7.3 异戊二烯类生物合成的无细胞研究 ………………… 209
第八章 酶学在生物学内外的影响 …………………………… 228
8.1 引言 ……………………………………………………… 228
8.2 非酶蛋白质 ……………………………………………… 232
8.3 酶作为生物学工具的应用 ……………………………… 235
8.4 酶学概念的影响 ………………………………………… 239
8.5 生物化学在最近和将来的发展 ………………………… 243
参考文献 ………………………………………………………… 247
索引 ……………………………………………………………… 265

第一章　初期的酶化学

Colin J. Suckling

(Department of Pure and Applied Chemistry,
University of Strathclyde, Glasgow, UK)

当最初计划编写这本书的时候，心中的想法是通过几个人执笔写的相互有关的一系列论文来综述过去30年中酶研究对某些重要化学领域的影响，却不料由此而发现19世纪文献中记述的酶已经激起了大量的化学研究，其中有一些已带有明显的现代腔调，这一点读者在以下内容中将会看到. 早在1833年，对于马铃薯淀粉自然水解的现象就作了一些观察，但是当时人们心目中活力论的概念还占有很大位置，难以接受生物催化剂的存在. 酶是化学制剂的想法引起了漫长的怀疑和纷争. 在19世纪上半叶又认识了一些自然发生的反应，特别是与酵母有关的发酵作用. 有人主张这些发酵作用所依赖的酶活性与活细胞是不可分的，其中Pasteur 就持这种观点. 另一方面，Liebig 还有 Wöhler 把酶看作能从细胞分离的化学催化剂，尽管组成未知. 实际上这两人可能在 Liebig 的《药物学年刊》的一篇未署名文章（Anon.,1839）中就讽刺了活力论. 在这篇游戏性文章中我们读到如下关于引起化学反应的论述：

> “从显微镜观察看到，在糖溶液中从卵(酵母)孵化的小动物形如 Beind 氏蒸馏装置，但没有冷凝器…. 这些小动物没有牙也没有眼，但有胃和膀胱，膀胱装满时像个香槟瓶…，贪吃糖而产生排泄物——酒和二氧化碳.”

终于通过实验解决了争论. 1897年，Buchner 证明酵母的萃取物能够支持糖的发酵，不过几年之前，Emil Fischer（1894）的

实验室已经开始作出一系列令人瞩目的贡献．这些论文使人读之神往，不仅由于它们的科学内容，还因为它们传达了巨大的热忱，有时质朴，但总是有证据的． Fischer 倾注他有力的实验技能和透辟智慧的主题是酶催化中的立体选择性，这是一个至今仍很重要的领域；酶在立体异构体之间作出选择的能力是它们最诱人的性质之一．

Fischer 的论文(1894)由于他的一些发现，也由于他对未来发展的有创造性的见解而令人瞩目． 他当然地特别适合从事立体选择性问题的研究，因为他有丰富的一系列立体异构的糖类可供利用，这是他合成出来用以测定构型的．这些化合物的衍生物被用作糖苷酶的底物，这些糖苷酶即使在当时也能以粗的无细胞的形式得到．他的论文开头写道：

> “各种立体异构的己糖对于酵母的不同性质使Thierfelder 和我提出一个假设，即酵母细胞的化学作用物(chemical agent)只能攻击它具有相应构型的那些糖．”

支持这个假设的事例之一，就是证明水解蔗糖的酶，Fischer称之为“转化素(酶)(invertin)”仅仅对 α-D-葡萄糖苷起作用，而 β-D-葡萄糖苷和 L-葡萄糖苷完全不被触动．毫无疑问，这并非只是偶然现象，因为发现第二个酶——苦杏仁酶，能水解合成和天然来源的 β-D-葡萄糖苷．这些结果互相补充其性质是带结论性的，并且当然地在现代立体化学研究中仍很重要． Fischer 对他所得结果的评定十分吸引人．它也可作为本书美妙的序言，因为它预示着许多随后的内容．当更往后读时，你可能有兴趣反思以下几行：

> “但是结果足以在原理上表明，对于底物的构型，酶是具有选择性的，像酵母和其它微生物一样．在这方面，这些现象之间的类似表现得如此完全，以致人们会假设它们有相同的起源，因此我又回到前面提到过的 Thierfelder 和我本人的假设．转化酶和苦杏仁酶有许多可觉察的类似点，并无疑是由不对称结构的分子组成的…，用一个形象的比喻，我想说酶和糖苷只有彼此配合，像锁和

钥匙一样，才能互相发挥化学影响…. 不久后发现，对于复杂的酶已证明的一些事实也适于较简单的不对称作用物.我丝毫不怀疑酶将对测定不对称物质的构型有用….关系到分子的不对称性，活细胞的化学能力与化学'作用物'的作用之间的差别，尽管较早被很广泛接受，但实际上并不存在."

虽然引用的最末一句是针对 Fischer 同时代人的，而以上摘录对于几乎一个世纪后的现代化学家，读起来还是惊人的新鲜.我们有在一些技术上胜于 Fischer 的优点，但是他所提出的某些概念还有待于我们圆满地领悟，像下面我们将要看到的那样. 不过 Fischer 也完全不是立体化学领域中唯一的科学先知，他的工作大大地有赖于 Pasteur 所发展的认识. 现代立体化学研究几乎没有不从这两位大科学家的实验与概念上的贡献得到知识的（见 Robinson, 1974).

在 Fischer 的时代，用不纯的酶制剂取得的成就是惊人的.今天能与之相比的，要算是含未纯化神经递质或激素受体的制剂的研究了，而且这些研究现在已能用色谱技术纯化解决了. 正像 Fischer 所预见的那样，酶已广泛用于测定构型，但是直到近些年才有"较简单的不对称作用物"能再现酶的立体选择性（见第三和第四章). 毫不奇怪，永远热心进取的 Fischer 本人甚至也尝试了一下不对称合成（Fischer 和 Slimmer, 1903,见图 1.1). 知道葡萄糖是手性的，Fischer 希望自然界存在的一种绣线菊苷能够以某种方式受到葡萄糖环所造成的不对称环境的诱导，在羰基上进行不对称加成. 这个方法后来被证明是成功的（第四章)，如果 Fischer 用了更庞大的亲核剂，他很可能会获得成功. 他最初尝试把氰化氢加成到绣线菊苷上并将得到的产物水解，结果得到无光学活性的产物. 因此 Fischer 再试用二乙基锌，这一回由真空蒸馏得到的产物是光学活性的. 在发现新事物的兴奋中，他写道："…由此我们相信，我们解决了不对称合成的问题."! 然后遇到了障碍，像吉尔伯特喜剧似的"改变了欢天喜地". 严格控制的实验

清楚地表明，表观的不对称诱导是由于在蒸馏中从葡萄糖来的不纯物，后来没有再报告另外的尝试。许多人曾经有类似的但未发表的工作。

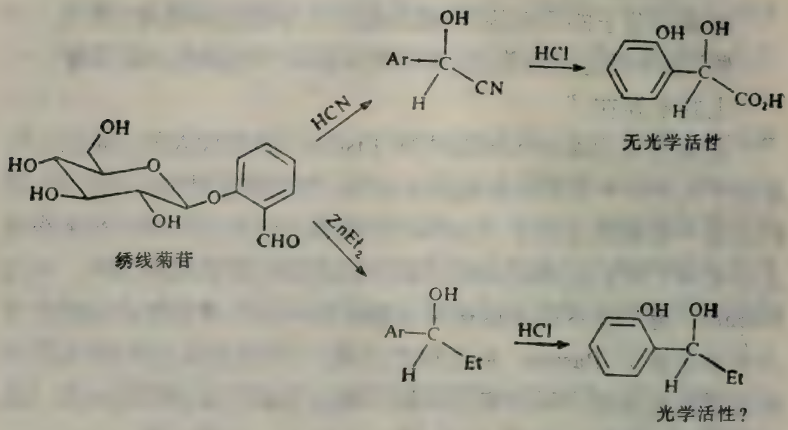


图 1.1

20 世纪伊始也标志着合成上应用酶迈出了第一步。Croft-Hill(1898)证明，酵母的酶能在合成上应用，Emmerling(1900)报告了一个利用酶合成苦杏仁苷的实验。Hoesch(1921) 在德国化学会志一个完全刊载 Fischer 传记的专辑中援引了这些以及其他一些先驱者的贡献。Hoesch 的许多见解在 60 多年以后的今日还同样适用。例如，在总结 Fischer 对酶化学的贡献时，Hoesch 指出："纯粹化学家肯定会对 Emil Fischer 的一些酶研究感到不自在"。另一个值得注意的见解是 Fischer 描述酶特异性的锁和钥匙的比喻在当时很受赞赏。从 Hoesch 的回顾和 Fischer 自己的写作看，似乎 Fischer 从来没有想把这个比喻作为科学的假设，不过是用它来对完全不熟悉新概念的听众形象地说明立体化学上的生物特异性这个概念而已。当然，现代的工作弄清楚了，锁和钥匙的物理刚性对于具有构象活动性的酶-底物相互作用是不能作出合适描述的。他一经用酶说明了生物特异性，就热心地讨论起像毒素之类其它生物体系的行为中类似的互补作用了。然而，朴素

的比喻，肯定是有生命力的.

我们的故事还有一部分是在19世纪90年代开始的. 那时科学家不仅研究微生物的酶，也开始研究哺乳动物系统. 1898年证明了肾脏含有蛋白水解活性（Tigerstedt 和 Bergmann, 1898）. 进一步研究表明，血管紧张肽原酶（renin）能水解一个大的血浆多肽（现在称它为血管紧张肽原）成为血管紧张肽 I. 我们现在知道后者在中枢和周围神经系统中只有极小的活性；它进一步被血管紧张肽转化酶水解为一个较小的多肽，血管紧张肽 II. 血管紧张肽 II 对循环系统有强效应，该转化酶的抑制剂的研究最近已发展成为现代药物发明的一个典型事例（见第五章）.

虽然许多现今的工作在世纪交替时已经有了预兆或者甚至已经开始，但是从那时起，化学家同酶的接触比较疏远了，以后50年也是这样，除某些名人是例外，化学家们多从事有机化合物反应性的系统研究. Robert Robinson 爵士就是例外者之一. 他在对于天然产物化学，当然也对关系到反应性的思想作出巨大贡献的同时，体会到酶是在极温和的条件下催化反应的，他开始寻求实验室合成生物碱的方法（Robinson, 1917）. 与此同时，生物化学家们想要详细探索酶究竟是什么，并着手酶的纯化. 19世纪20年代 Willstaetter 开始了最初的系统努力，但第一个实质性的成功来自 Sumner，他在1926年报告了脲酶的结晶作用. 或许因为不能相信别人先做到了，Willstaetter 争辩说 Sumner 没有真正得到酶. 然而不久就有一些蛋白水解酶被纯化得到结晶，并且弄清楚了酶像 Fischer 所推测的那样，是蛋白质.

虽然从那时以后已经能得到纯化的酶，但化学家们没有表示准备接受大分子的概念，更别说大分子催化剂了. 高分子化学创始人之一 Staudinger，在一次会议上想要说服瑞士化学会相信大分子存在，遇到了极大困难，会议在喧嚷中结束. 在伦敦皇家学会的一次会议上，一个年青的物理化学家 McBain 关于胶束本性的一些想法受到了同样的怀疑. 人们告诉他，他的分子聚集体见解是"谬论". 在德国，Hans Fischer 通过降解和合成确定了卟啉

类的结构，而迟至 1937 年似乎还不知道卟啉类在生理学上的重要性，虽然在 20 年代中期 Keilin 已经报道了一些含卟啉的蛋白质——细胞色素的分离。尽管他们关于酶的认识有暂时性和急性的近视症，但化学家们这时候在了解有机化学机理的基础上正取得巨大进展。正在此时，人工高聚物的合成被证明，天然大分子也变得受尊重了。有机化学和酶化学共生式地成长，概念上的基础建立起来了。本书将细述这一成长的某些分支。

在酶的性质中，对化学最有意义的是什么呢？首先，酶是极优良的催化剂。实际上有人主张酶已进化到使它们的催化功能臻于完善(见第二章)。如果是这样，那么，了解酶催化的化学基础是对化学家的一个艰难的挑战，有效的模仿它就是更大的挑战了。可是，在这些纯科学目的之外，酶所具有的性质还有非常重要的实用价值。正像 Fischer 所推测的那样，催化作用的选择性是最重要的应用之一，它可以在有机合成中直接用来实现位置选择性和立体选择性转变(第四章)。此外，选择性酶抑制剂作为药物用于治疗细菌性和病毒性疾病，也很重要(第五章)。

在过去 20 年中，我们对酶催化之化学基础的了解已有长足的进步，酶催化的应用以及有关的酶化学正在迅猛发展。在以下各章中，不同国家不同背景的作者联系两个广泛的主题讨论酶化学，第一个是合成有机化学。你将读到辅酶作用机理的研究怎样导致一些新颖的合成反应(第三章)。辅酶对有机化学家是一个好的起点，因为它们是比较小的分子，即使没有酶存在也带有一些固有的催化活性。能观察到的宽广范围的反应性本身就引人入胜，而 Shinkai 教授还第一次评述了很多最新工作。传统的合成反应与酶催化反应和仿生体系在选择性上的比较是我本人承担的课题(第四章)。第二个主题，对比而言，是关系到更多生物学上有意义的课题。酶化学与化学疗法的关系，在有机和无机方面分别放在第五章和第六章中讨论。生物合成的研究一直在有机化学和生物化学之间建造桥梁，这个领域的一些新近发展由 David Cane 在第七章中评述。酶化学从生物化学得到了许多也给予它很多，本书

末章考察将来两学科之间的相互作用(第八章). 为这些讨论提供基础，也为了说明酶的性质激起的对催化作用本身思索的深度，Kluger 用关于酶催化的机理基础的某些思考开始了本书的一些短论(第二章). 有趣的是，几位作者在一定程度上不谋而合地从不同观点讨论了几个主题领域. 这些课题包括酶立体化学（第二至五章)、前列腺素化学(第四和五章),β-内酰胺抗菌素(第四、五、七章)，环糊精(第二至四章)和遗传工程(第四、七和八章). 虽然也可以选择另一些化学领域进行讨论，但这七篇短论将更能使读者深入的了解酶化学对实验室和工业化学的影响，以及化学与生命科学的联系.

现在该是让每位作者自己讲话的时候了. 在编辑本书中，我从同行撰写人那里学到很多，我确信他们将让读者也相信酶化学对化学作出了很多贡献,而且现在还是生气勃勃、充满活力的. 随着科学的继续发展，对生物化学的新挑战正在涌现，化学家在方法、概念和技术方面已从酶学到许多，完全能更好地迎接这些挑战. 像前面已提到的，现在已能纯化其它一些蛋白质，特别是抗体、神经递质和激素受体. 在 10 年时间中，或许有人将为受体和抗体化学之影响撰写导论.

第二章　酶催化的机理基础

Ronald Kluger

(Department of Chemistry, University of Toronto Ontario, Canada)

2.1 引　　言

这一章的目的是提供物理有机化学与酶化学的一些概念之间的联系，为此，对连通这两个领域的某些最有用的途径作一通盘考察. 然而，这一课题涉及面广，我们不得不有所选择. 因此本章中引用的参考文献旨在对于在此所提出的一些问题给读者介绍一些更充分的论述. 我们选择了一些综述或广泛的讨论，而不是援引一些实验观察和原始推导.

酶是值得注意的催化剂. 通过生物的进化，它们发展出处理一些代谢底物的能力，具有超等的效率和特异性，这些虽然非凡而惊人，但在很大程度上可以从反应机理的角度加以理解，因为进行的是有机分子的转变. 阐明酶催化的机理基础已成为有用的研究，因为当我们了解酶怎样完成它们的任务时，常常发现了新的催化机理. 有了这种知识，我们就可能开始设计或修饰一些分子成为有用的催化剂，或者在酶的代谢功能之外，应用酶本身作为催化剂. 研究酶催化的机理基础，实际上意味着寻找我们能够理解和利用的模式和解释. 因此，已经很明显，酶催化的研究很重要，不仅是作为传统的生物化学上的探索，而且也作为发展某些方法的手段，它们对新催化体系有用. 这些说法的全部意义在下面三章中将显示出来.

酶化学机理方面的影响已使得对物理有机化学原理的兴趣增

加．物理有机化学家关心有机分子的诸性质与这些分子对结构和反应性的系统关系．酶化学是这种兴趣的逻辑延伸，因为酶反应的主要特点——催化作用和特异性，正是属于物理有机化学范围内的概念．我们将回顾与酶化学中一些问题相关的物理有机化学的某些领域．有了这个背景，我们就可进而考察酶化学研究对机理和结构有机化学研究的现代途径所发生的影响．

2.2 催化作用的一些概念

纵观酶催化反应的类型，揭示它对有机和无机反应的通常类型都适用．这些类型包括取代、消除、加成、氧化和还原．这种反应模式把原料与产物之间的关系作了分类；而机理提供发生联系的手段．虽然酶催化反应的类型很明显，但机理则往往是猜测性的．在能得到够用的信息时，如果能将反应系统地划分到机理类型，如 Ingold 分类（Ingold, 1953），那是有用的．这种分类最常见的例子是两个一般的亲核取代机理 S_N1 和 S_N2． Walsh(1979) 撰写了以反应类型和机理为依据的优秀而全面的酶催化反应的评述．此外，也发表了一些关于一般酶催化作用机理的优秀综述（Bruice 和 Benkovic, 1966; Fersht, 1977; Scrimgeour, 1977; Metzler, 1977; Jencks, 1969, Bender, 1971; Cunningham, 1978）．既然已有这些广博的综述，我决定对这一主题采取稍稍不同的处理．我提出这样一个问题：对于观察酶机理有关系的物理有机化学的关键概念是哪些，将给出一些能说明问题的例子，不过得承认我对自己感兴趣的领域有些偏向．

2.3 机理的描述

化学反应中所发生事件的完整描述，特别是溶液中发生的反应，不论催化的或非催化的，都是办不到的，因为可以用众多独立和非独立的变量来描述一个反应．在反应中，除底物发生变化外，

可能还需要知道溶剂的功能和它所经历的再组合(Ritchie,1969).显然,在每一分子坐标的层次上详细了解任一反应,是不切实际的目标.然而我们还是希望知道在机理意义上一个反应的途径.在反应中底物怎样变化,在保证效率和特异性中酶的分子功能是什么?转变在定量上能否与不包括酶的反应相比较?有了这些知识,我们就能足够详细地了解在促进和控制反应中酶所起的作用.我们也将能够根据分析酶体系所得到的知识着手设计催化剂(见第三和第四章).

动力学方法很可能是为分析酶作为催化剂的效力提供基础的最有用的工具.通常我们能够测定一个酶催化反应的实验速度公式,并可以应用稳态方法计算与这个速度公式相联系的速度常数(Segel, 1975).由此可以在稳定物种和中间体之间的转化方面确定逻辑顺序.

通过应用如同位素交换(Segel, 1975)、前稳态分析(Fresht, 1977)和其它一些快速技术,可以进一步改善对酶反应的这种一般性描述.有了这一组定量信息,我们就有可能对照一个标准来标定酶作为催化剂的效果.与没有酶存在的同样反应进行对比是一个有用的方法.我们知道酶很可能是通过一系列步骤来催化反应的.如果能使作比较的反应各步都与酶反应重合,那是最有帮助的.然后,通过比较类似的酶和非酶动力学,我们就能够按特有的能量学来描述酶的功能(良好实例见 Hall 和 Knowles, 1975).为了做到这一点,我们必须能在普通动力学的基础上分析酶和非酶体系.进行这种比较必须掌握对两个过程相当多的信息,包括关于鉴定速度控制步骤的知识.

由于这些原因,动力学方法是特别重要的,因而我们将从回顾物理化学家用来简化多步骤体系分析的某些概念开始.首先,任何多步骤反应中,反应物转化为产物的速度是用一个复杂的速度方程式描述的,它时常可以用稳态假设加以简化(见 Hammett, 1970, p.77—79).如果在反应途径上有一个反应活性中间体或一个带有催化剂的反应活性复合物,那么,远在体系达到它最后的平

衡终点之前，它就达到一个所谓的稳态．在这稳态中，以低浓度存在的一些中间体发生的浓度变化与被观察的反应物或产物相比较是很小的．这个简化方法特别适合催化体系，因为底物与催化剂形成的复合物通常以很低的浓度存在（Klotz,1976）．在酶反应的情况，酶的浓度必然很低(因为它的分子量很高)．在其它一些反应中，活性中间体也是高能量的，结果也将以低浓度存在．当浓度变化变得不能检测时就出现稳态．按照这个定义，平衡就是一个永恒的稳态．然而，我们在这里所论及的稳态将是一种非平衡状态，一旦为稳态提供‘燃料’的组分耗尽，它就将消失．（生命是一个稳态；死亡是一个平衡）．

2.3.1 速度控制步骤

鉴别出速度控制步骤是应用任何速度方程的必要条件．Murdoch（1981）对这一主题提出了特别明晰的讨论．简短地说，在任何多步骤反应中，假定不存在比反应物或产物更稳定的中间体的话，发生在速度控制步骤之后的一些步骤对反应物转化为产物的速度没有影响．如果有一个中间体更稳定，那么该体系应当作为两个分别的过程，而不是作为一个稳态体系来处理．速度控制步骤是速度最慢的，而不是具有最小速度常数的一步．因为速度依赖于反应物浓度和速度常数，速度控制步骤是进行这一步的各物种的浓度以及这一步反应所遇势垒的函数．在速度控制步骤之前的各步为速度控制转变前面的状态提供物料流．这意味着可以通过找出具有最高能量过渡态的一步来识别速度控制步骤．在确定机理之后，我们可以比较某一中间体所进行的任何两个过程的相对速度，较快的那个过程不可能是控制速度的．对每个中间体作比较，直到得出自洽的答案．用此法分析一组复杂数据的例子见 Kluger 和 Chin(1982)．

2.3.2 微观可逆性的重要

微观可逆性原理要求前进方向的最低能量途径与同样条件下

逆反应的相同.如果前进方向有两个竞争的途径,它们也会在逆方向竞争，而且达到同样程度．忽略了这一点可能导致错误的、给出相矛盾的结论．微观可逆性原理不要求所有分子都按同一途径反应——它是一个统计学的描述，也就是说事物是按照它们能量的大小分布的（Hammett，1970）．如果该原理能肯定在一个方向哪一步是最慢的，我们就知道在另一方向它也是最慢的．相竞争的途径必须在相同条件下在两个方向中竞争到同样程度．我们可以利用这一事实从实验上最方便的方向挑选考察步骤．我们应当通过研究逆过程并且考察定量上的一致性来确证所得结果．

应用这一原理的一个例子是 Breslow 与Wernick （1976）关于羧肽酶A催化多肽水解机理的研究．有人已报告该酶在催化水中用同位素标记的氧时已掺入 *N*-苯甲酰甘氨酸的末端羧基中．在任何多肽的水解中,水必须掺入到产物羧酸中.假如反应经由酰基酶中间体而进行，那么酶应当能在无任何自由胺的存在下催化末端羧基与溶剂水之间的氧原子交换(图 2.1)．如果需要胺,那末交换就不能说明酰基酶的存在，因为肽键的形成也从羧酸除去氧原子.随后的水解把溶剂中的同位素引入羧基(图 2.1)．

$$(1)\quad RC(O)NHR' + EXH \rightleftharpoons RC(O)XE + H_2NR'$$

$$(2)\quad RC(O)XE + H_2O^* \rightleftharpoons RC(O)O^*H + EXH$$

$$RC(O)OH + H_2O^* \xrightarrow{E} RC(O)O^*H + H_2O$$

或 $$RC(O)OH + NH_2R' \xrightarrow{E} RC(O)NHR' + H_2O$$

然后 $$RC(O)NHR' + H_2O^* \xrightarrow{E} RC(O)O^*H + NH_2R'$$

图 2.1　Breslow 和 Wernick(1976)所报告的羧肽酶催化的羧基氧交换两种催化机理之间的区别

Breslow 与 Wernick 证明,只有存在掺杂的氨基酸时,^{18}O 才从水掺入 *N*-苯甲酰甘氨酸的羧基，而在无氨基酸存在时则不发生有动力学上适当速度的进入羧基的交换．因此，只有通过完全水解和它的可逆反应才发生交换．

2.3.3 Curtin-Hammett 原理

在物理有机化学中绝对预见性的规律极少，但是有许多正确预测趋向的规律. 一个非常有用而又准确的规律被称为 Curtin-Hammett 原理，首先由 Curtin(1954)明确地阐述，他又把这归功于 Hammett 的教导. 这个原理是以过渡态理论为基础的. 它告诉我们，两个反应的产物之比，只依赖于它们的相对生成速度(Eliel, 1963, p. 149—156). 例如，如果两个反应物是构象异构体(conformer)，那么两者相互转化的势垒，相对于反应的势垒来说是小的，因而从每个构象体得出的产物的产率只取决于过渡态的能量而不依赖于两个构象间的能量差. 其结果，关于产物比值的信息告诉我们的是相对的过渡态能级，而不是起始两构象的相对量. 另一方面，如果两个构象体相互转化的势垒大于反应的势垒，那么由反应产物之比就可得知构象布居数. 在中间情况，如果能得到详细的速度信息，产物比就是有用的数据了. 最近 Bosnich 与同事(MacNeil 等，1981) 提出了这个原理的一个完美的应用. 这一工作也与仿生合成有关(第四章). 在不对称氢化中，两个中间体差别在于互为构象异构体(图 2.2). 但是，两个构象体中不论哪一个的氢化步骤都具有高于构象异构化的活化能，因此产物的产率

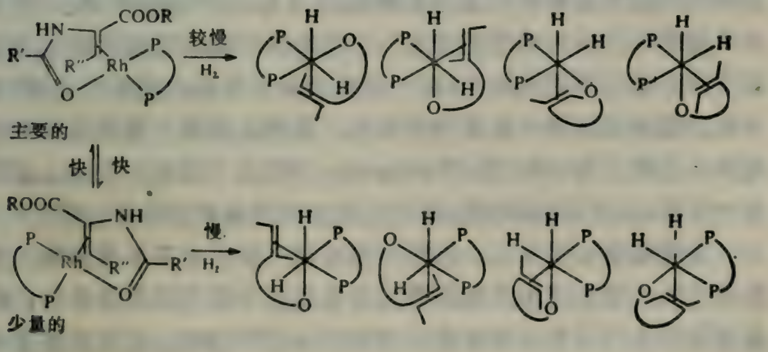


图 2.2 手性均相氢化的机理，说明 Curtin-Hammett 原理的应用(MacNeil 等，1981)

是由过渡态能量而不是构象布居数控制的．过去这一领域有的工作者没有认识到这一事实，因而报告了几个错误的结论．

因此，在分析酶反应时，只有与总的转变相比较构象互相转化速度是慢的时候，我们才必须关心底物构象的影响，这种情况是很罕见的．所以，用酶对一个中间体的特定构象形成刚性结合，其好处不大，如果不如此，这个构象也容易由热运动达到．在非环结构和多数环结构中，绕单键旋转的相互转化势垒比反应的势垒小，其结果，优化反应物构象的一些因素对催化影响也极小．

然而，构象对酶催化反应的影响，作为反应特异性的基础可能是至关紧要的．如果从单一中间体能生成几种产物，酶应当保证产物是所需要的那一个而不是无控制的分布．产物选择的立体电子控制是构象受到酶控制的后果．

2.3.4 立体电子效应

一个酶以绝对的立体特异性催化单一反应的能力，对这个酶的催化过程的性质加上了一些严格限制．酶怎么能排除同一中间体在非酶反应条件下会是有利的一些反应途径呢？

试考察酶催化乙酰乙酸的脱羧反应．这个反应已由 Westheimer 与同事证明（Westheimer, 1969），是经由酶的一个赖氨酸残基与底物的羰基衍生的亚胺基酶［图 2.3，(*2.1*)］而进行的．失去二氧化碳以后所生成的产物是一个由酶与丙酮衍生的烯胺 (*2.2*)．为了让丙酮离开活性位点，这个烯胺必须互变异构到亚胺上，然后水解．已证明这两步都是酶催化的，因为该酶催化氘由氧化氘溶剂掺入丙酮（Tagaki 和 Westheimer,1968）．因此，在酶上必须有一个碱，以便从丙酮亚胺除去质子生成烯胺和进行逆过程．

这些观察似乎暗示，该酶可能对同一底物有双重特异性．如果从乙酰乙酸和酶生成亚胺产生容易失去二氧化碳的加合物，那么亚胺的生成通常会增加来自底物的 α-氢的酸性，促进亚胺互变异构变为烯胺(在下一段中将对一个有关体系描述详细过程)．烯胺不会脱羧，因为已不再存在共轭不饱和结构(*2.3*)．那么酶怎样

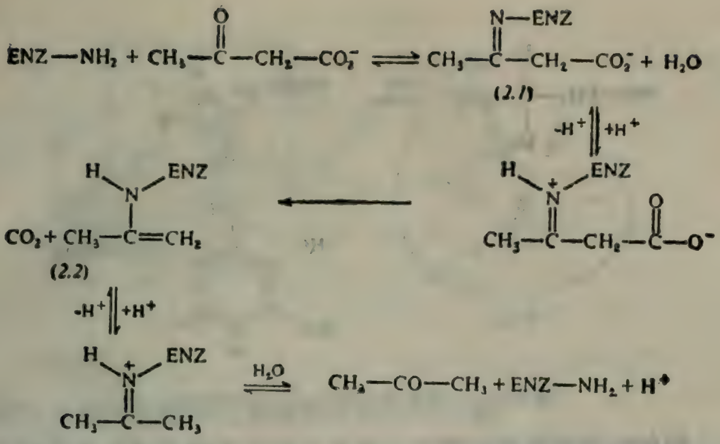
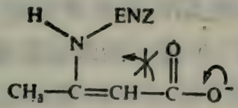


图 2.3　乙酰乙酸脱羧酶催化的乙酰乙酸脱羧反应的机理

防止沿这条非生产性途径进行呢?



(2.3)

这个问题最初是Dunathan(1966)针对一些依赖于磷酸吡哆醛的酶的特异性提出来的．这些酶是通过在底物氨基酸与磷酸吡哆醛(PLP)的醛基之间生成亚胺阳离子衍生物而起作用的(图 2.4)．亚胺阳离子基团一经形成，它的 π 体系就可能活化几个反应．例如，连接在碳上的质子通常是很强地键合到碳上，不会在水性的碱中交换．但是，假若连接质子的那个碳原子与羰基或亚胺阳离子相邻，就相当容易发生交换．除去质子得到的产物是相应的烯醇盐或烯胺，其中随着电子离域到杂原子，两个碳原子间有相当显著的双键特性．在为了质子离去的过渡态中，本来可能会定域在碳上的负电荷发生这种 π 离域，使碳素酸的共轭碱稳定化．导致这种离域体系的过渡态应当反映构成产物 π 体系的一些轨道的重叠特性．因此，过渡态的构象应当能保证这种重叠．从另一方面看，如果不能达到这种构象，那么 C—H 键的活动性就会受到阻碍．

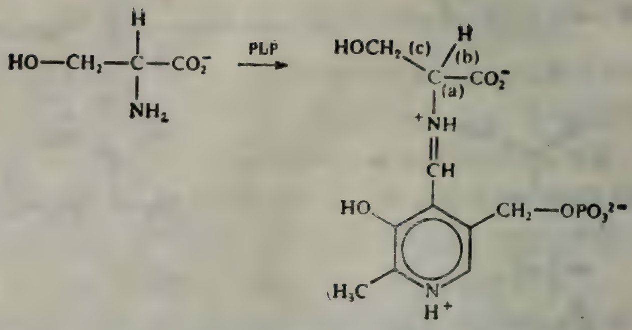
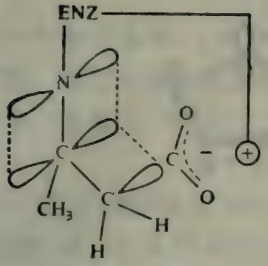


图 2.4　5′-磷酸吡哆醛与一个氨基酸的缩合

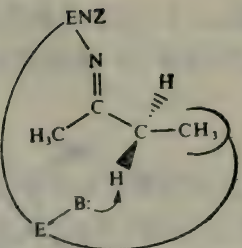
酶能够很容易地利用这个现象．如果底物被静电相互作用结合在相对刚性的构象中，那么当生成亚胺阳离子衍生物时，这个构象将决定哪些键被活化．酶可以通过蛋白质的正电荷与底物羧酸根的负电荷之间的静电相互作用来控制这个构象．在氨基酸的 PLP 衍生物的情况，有三个键可能因重叠而被活化．第一个[图 2.4 中的(a)]是连到羧基上的 C—C 键；与这个键重叠使酶成为一个脱羧酶．与 C—H 键[图 2.4 中的(b)]重叠将活化 α 质子；一个邻近的碱可以在氨基酸发生脱氨基或外消旋化之前除去这个质子．π 体系和 σ 键与侧链[图 2.4 中的(c)]重叠将使酶起醛缩酶的作用．

已得到有说服力的证据，说明依赖于 PLP 的一些酶确实利用这个特点来控制特异性 [Dunthan (1967) 提供了一篇早期的综述]．已设计出许多很有特异性的酶去活剂来利用依赖于 PLP 的一些反应的机理 (Abeles 和 Maycock,1976; 见第五章)．

我们可以用特异性立体电子控制的概念来解决关于乙酰乙酸脱羧酶特异性所提出的两难推断．如果酶结合乙酰乙酸亚胺正离子衍生物的构象妨碍 C—H 键与亚胺正离子官能团的 C═N 发生重叠，那么质子不能被活化转移给碱 (*2.4*)，即令有一个碱靠近质子，也不发生质子转移，因为过渡态不能被稳定化．但是，连接羧基的键确实与 π 体系重叠，而且它将被活化而发生脱羧反应，没



(2.4)



(2.5)

有竞争反应使总循环变慢或破坏酶的特异性.

这种解释的证据来自研究被乙酰乙酸脱羧酶催化的一些化合物的反应，这些化合物本不是它正常催化循环的部分. 已经证明，丁酮结合到酶正常结合底物的位点上. 例如，当丁酮与酶一起在氧化氘中培养时，在 C-3 上的 pro-R 质子被交换的速度，比 pro-S 质子快得多(Hammons 等，1975；Benner 等，1981；对此处所用立体化学术语的讨论见 Eliel, 1980). C-1 甲基的质子处在同拓扑的（homotopic）环境，并且以相等的速度交换. 但是，因为亚甲基质子的交换涉及对映体选择，这一反应必须在活性位点的手性环境中发生(2.5). 交换比没有酶存在时快得多，因此酶必定是在活跃地催化着交换过程，可以设想很可能经过亚胺正离子衍生物的形成过程. 另外一个例子见 Kluger 和 Nakaoka(1974).

一切包含 C—H 或 C—C 键断裂或形成的酶反应应当能作类似的分析. 最近我们根据硫胺素与丙酮酸加合物的膦酸类似物 X 射线晶体结构的外推，分析了该加合物最可能的结构（Turano 等 1982). 在生成丙酮酸与硫胺素之间 C—C 键中最大重叠方向产生的结构，同时也使羧基的 C—C 键排列得能与处于最适合脱羧位置的硫胺素中噻唑阳离子环的 π 体系重叠. 因此，两个主要催化步骤是结构上相关联的(图 2.5).

总之，虽然底物中的构象因素对加速酶催化中任何步骤影响都极小，但它们对控制选择性时常是很关键的. 现在我们来考察

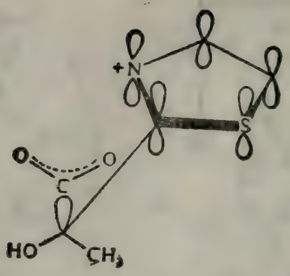


图 2.5 硫胺素与丙酮酸的加合物. 在此构象中可以消除 CO_2 或者丙酮酸(引自 Kluger,1982)

催化作用的根源.

2.4 熵与酶催化

2.4.1 熵的分子基础

物理有机化学对于酶催化的另一应用，是分析酶用来加速被结合底物反应的手段. 现今讨论这一主题大多包括对底物与酶结合时熵的损失与催化效率的增益之间的关系[充分讨论见 Jencks (1975)]. 已提出详细处理熵效应与催化速度常数的关系,在本章稍后一些我们将介绍这样的讨论. 但是,为了使讨论更有益处,在这里回顾一下关系到熵的有关方面的一般概念和方程或许是合适的.

热力学和统计力学得出了一些用热函和熵表达自由能的公式. 因为自由能直接与化学平衡有关，在研究化学现象时热力学状态函数是极有用的.在恒压下自由能随温度的变化被定义为熵. Gibbs 自由能(G)的定义由下式给出:

$$G = H - TS$$

其中H是热函,T是绝对温度,S是熵. 因此自由能对于T的导数是S.这类型的方程式与分子现象和机理的关系来自统计力学的应用 (Denbigh, 1964,第 III 部分):

$$G = E - RT\ln Q + RT$$

量 Q 是一个配分函数，它是分子能态几率的总和；E 是热能；R 是气体常数．解以上两个表达式求上述自由能 G，得到可以用来定义熵的单一方程式：

$$S = (E/T) + R\ln Q$$

由于 E/T 是保持恒定的，要求熵变化值所需要的只是 $R\ln Q$ 这一项的差异．从 A 到 B 的熵变化是 $R\ln(Q_A/Q_B)$．如果能推导出两个物种的配分函数，就能推算熵对于自由能改变的贡献．

配分函数 Q 可以因数分解为其总和等于某一化学物种总能量的各组分，即在恒定电子能之下移动、振动和转动的贡献．移动的贡献可以通过对粒子能够在各能级中分布方式的数目，应用统计分析来计算．质量为 m 的粒子在体积为 V 的容器中有如下配分函数：

$$Q = (2\pi mkT)^{3/2}V/h^3$$

其中 h 是 Planck 常数．

由于物种的排列方法和能级不依赖于粒子的个性，N 个分子的移动熵的表达式统计上校正为：

$$S = R[5/2 + \ln(2\pi mkT)^{3/2}V/Nh^3]$$

这个表达式被称为 Sackur-Tetrode 方程式，它在提供原子和分子移动熵的准确数值上的有效性，已在过去 50 年间众多实例中由实验确证．因此我们可以用这个表达式来计算一个分子与酶接触之前的移动熵．

Sackur-Tetrode 方程预计，像分子量 100 的底物这样的物种，在浓度 $10^{-6}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液中将具有约 60 熵单位的移动熵．因此，在 300K，分子被结合到酶上而固定化，导致移动熵的损失相当于自由能减少 $18\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$($75\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)．这必须在很大程度上由导致底物与酶缔合的有利相互作用来补偿．

转动熵和振动熵也可以从对适当配分函数的知识来计算．在一个分子的总熵中转动贡献比移动贡献小得多．因此底物与酶的结合通常不会引起这个量有很大改变．振动贡献通常小到可以忽

略不计.

总之,一个分子的移动熵可由根据上述推导的Sackur-Tetrode方程式近似地求得,在推导中根据对自由能的统计力学与经典定义得出了该方程.

2.4.2 结合与酶催化

物种之间发生双分子反应的机会在稀溶液中显然比当两个物种彼此相接近时要小. 为了让它们在有效的时间内相接近,必须有一个起催化剂作用的第三者将它们维系在那里. 酶的很重要作用之一就是这种功能. 它应当能通过保持它们互相靠近,并且以如此方式排列,让它们的接触能导致化学反应,从而促进两个物种起反应.

酶的底物结合位点具有能量上有利于底物缔合的官能团. 当一个在溶液中能自由运动的分子变为以特定方式与酶缔合时,发生相当的熵损失,这将被有利的结合相互作用所补偿 (Westheimer, 1956). 这种通过用酶的热函来"陷捕(trapping out)"熵的形式适用于与酶相作用而最终彼此相作用的任何数目的不同类型的底物分子. 如果结合的熵损失已经被同时产生的有利的热函相互作用所补偿,那么与酶缔合的分子已发生生产性的转变,即由溶液中随机运动的个体转变为催化表面上生产性排列的反应伴侣. 可以把它们看成是酶表面的附属物,而这样两个相反应的物种就变成同一分子的各部分了. 如果它们保持在促进反应的方式,那么反应的熵势垒的相当大一部分就被消去了 (Jencks, 1975).

怎样确定在任何特定情况下创造有利于反应的形势,是否能够或者能达到什么程度,在 60 和 70 年代是有相当大争议的问题. 有几种途径曾经风行,但后来发现不准确而被放弃. 虽然问题可能至今还没有完全解决,但似乎已达到一般性一致的认识,通过考察对熵的影响,结合与分子内反应的情况比较,可以作出逻辑而有理由的分析,如在下面几段中的解释. Jencks (1975)和 Bruice (1970) 对这一课题给出了全面的论述.

2.4.3 对酶催化的分子内类比

在双分子反应中，两个具有移动熵的分子当它们互相作用时要损失相当量的这种熵．因为如果两物种要起反应，它们必须不是彼此分开的，为了分析熵，两个分子可以作为单一体来处理．这样，相当于两者之一的移动熵损失了．在考察底物结合到酶上所引起的移动熵减少时，我们已看到，可以应用 Sackur-Tetrode 方程式得到熵变化的数值．在发生双分子反应时应当有类似的熵变化．

在酶反应中，由于结合引起的熵损失被底物与酶缔合时发生有利热函的相互作用所补偿．对于溶液中两个自由物种之间的反应，一般情况下，不发生显著的热函补偿相互作用．当然，有一些能与它们的反应伴侣发生有利相互作用的分子存在，有时它们被认为是“模型酶”．这一课题将在本章关于仿生化学的一节以及第四章中关系到合成时涉及．

在一个分子内反应中，一个以 1 $mol \cdot L^{-1}$ 浓度存在的反应物的定位相当于损失约 35 熵单位（10.5kcal · mol^{-1} 或 300K 下 44 J · mol^{-1}）的移动熵和转动熵．如果该物种预先以刚性方式与它的反应伴侣由共价结合而定位，那就可以避免这一熵损失．这相当于增加平衡常数约 4×10^7．

对照双分子对应面来校准单分子反应，最常用的方式是通过被称为有效摩尔浓度的量(这一课题的充分讨论见 Kirby, 1980)．双分子反应是由服从二级动力学的反应速度常数表征的．其速度常数 k 以 $mol^{-1} \cdot L \cdot s^{-1}$ 为单位，但相应的分子内反应的单位是 s^{-1}．分子内过程对双分子过程速度常数之比不是一个无量纲的数字而是有摩尔浓度单位．所研究的双分子反应的特定分子内类似反应将用单位为摩尔浓度的这个比，即有效摩尔度来表征（Kirby, 1980）．由于乘以摩尔浓度可以使双分子反应有可比的单位，可以说，分子内反应相对于双分子反应被一个表观的浓度因数加速了．这个因数在物理现实上的意义一直有争议．分子内反应的有

效摩尔浓度值已发现一些超过 10^{9} mol · L^{-1} 的,但这不能相应于物理上能达到的浓度.那么,这是否意味着分子内的现象应当从这个表观浓度以外的其它基础来考虑呢?

分子内效应的基础问题, Page 与 Jencks (1971) 已详细论述过,现在讨论的主要是他们的结论. 由于有效摩尔浓度实际上不过是速度常数之比,它不一定相当于一个仅靠增加浓度就能达到的现象,显然也涉及其它因素. 被保持在一起的两个起反应的物种具有单一物种的移动熵和大约两个分开物种的转动熵. 两个分开的反应物各自具有全部的移动熵. 两个反应物种结合为单一分子就消去了一个分子的移动熵. 由于为了发生双分子反应,无论如何这部分移动熵总是不能不损失的,在分子内过程中,实际发生的是对于双分子反应过渡态的预活化. 有效摩尔浓度以摩尔浓度单位量度分子内过程在熵上的利益. 在 2.7 节中将举出具有高有效摩尔度的反应的例子.

2.5 质子转移和催化作用

正像我们已说过的,当反应包含两个反应分子会合在一起时,就引起高的有效摩尔浓度,并可以观察到 10^{8}以上的数值. 实验室中进行的反应时常受到酸或碱的催化,但是包含在分子内一般酸或一般碱催化的反应从来没有表现大于约 60mol · L^{-1} 的有效摩尔浓度. Bernasconi 与同事 (Bernasconi 等,1982)对于有效的分子内质子转移的基础提出了犀利的分析. 控制转移过程有效性因素包括: 分子内质子转移的环大小(六员环最有效),给体与受体的酸性和碱性,反应介质的酸性,质子转移速度对受体碱性的敏感度. 关于酶催化的一个重要结论是,通过促进单个质子转移步骤不会发生大的加速. 但是,与其它步骤结合在一起时,这个因素有相乘性. 一个无效的质子转移将有重大的减速效应,而也是有相乘性的.

作为多数酶催化反应的一部分,发生 Bronsted 酸与碱之间的

质子转移，质子转移反应的细节已经阐明，并已出版了关于这一主题的几种著作(例如，Bell, 1973)。在酶反应的情况，质子转移通常与某种其它成键或断键过程相关联。

Eigen 与同事确定了质子转移反应的一些基本性质 (Eigen, 1964)。在热力学上有利的方向发生质子转移以质子扩散到水中为速度限制步骤。因此在扩散极限上发生的质子转移将有同样的速度常数。Eigen 测定这些速度常数是在每秒 10^{10}。如果已知质子转移反应的平衡常数 (从反应中两个伴侣的酸离解常数之比得出)，那么可以计算出在'慢'方向的质子转移速度常数。假如反应在能量上是对称的，那么无论哪一个方向都不会在扩散极限上，正反应和逆反应的速度将是不太悬殊，可以相比的。从一个酸到一系列共轭碱的质子转移速度作出的图称为 Eigen 图。所示是一个典型的图(图 2.6)。

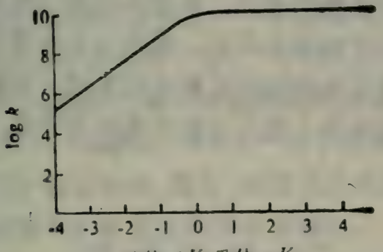


图 2.6 从一个含氧或氮酸到一系列含氧或氮碱质子转移的二级速度常数[$(mol/L)^{-1} \cdot s^{-1}$]

"受体 pK"一词指的是受体的共轭酸。速度常数达到最大值就是质子在水中扩散的速度常数

对于其中质子转移与某种其它成键或断键过程附带发生的一些反应(协同体系)，分析变得更加复杂。我们怎样能确定两步确实是同时发生而不是快速的先后相继发生的呢? [见 Jencks (1980) 的综述]。这是一个有意义的问题，因为它决定酸碱催化效率的限度。

被质子以外其它 Bronsted 酸的存在所加速的反应谓之一般酸催化反应，这是容易识别的，因为在保持酸度不变之下加入一种 Bronsted 酸(即一种缓冲剂)将增加反应的速度．由于缓冲剂包含酸和碱组分，必须评定改变缓冲剂配比的影响来决定是酸还是碱组分起催化作用．偶尔两种组分都是活性的．对于一般的酸催化，酸催化剂越强，观察到的速度常数应当越大．将观察到的速度常数的对数对催化剂酸的 pK_a 值作图，假如速度控制步骤的机理保持不变，通常得出一条直线．这个图被称为 Bronsted 图，它对分析酶催化的机理是极为有用的工具．

一个反应被缓冲剂所催化，表示在速度控制步骤中包含质子转移，但还没有识别这个步骤．得到的速度规律说明了在动力学上等价的机理(见 Bell，1973)．此外，关于质子转移单独发生还是与其它某过程附带发生的问题，Jencks (1980) 曾提出，假如质子转移连同别的断键或成键过程在单一步骤中发生，与过程分多步发生相比是较低能量的途径，那就会在单一步骤发生．这些规律应当也同样适用于酶催化反应，因为质子转移时常与附带其它过程同时发生．通过对溶剂同位素效应这样一些现象的解释，对酶反应在同样详细水平上进行分析正在变为可能（见 Schowen，1977)．

2.6 酶的效率

让我们考察一个酶催化单一底物转化为单一产物的多步过程．这个特定的酶作为催化剂与其它可能也催化同一反应的蛋白质相比较，究竟好在哪里？Hanson 与 Rose (1975)曾有说服力地主张，酶的效率是受到变异和改良支配的进化过程．如果我们考察体系的一些基础事实，可以看到怎样来建立一个标准．

反应物和产物的热力学关系是不依赖于催化过程的．反应的热力学分析告诉我们，不管转化将引起体系化学能净的增益还是损失，这些化学能都将转变为热和(或)功．一个吸能过程要求能

量输入，并且总是有至少等于起始原料与产物之间热力学差值的势垒。一个放能过程没有热力学势垒要克服，但它将受到底物达到酶和产物离开酶的扩散速度限制。吸能过程也有这种扩散势垒叠加在热力学势垒上。为了简化我们对效率的分析，我们将省去对热力学势垒的考察，但将记住，必须把它叠加到我们得到的任何结论之上。

我们知道，在任何多步骤反应中，最重要的势垒是速度控制步骤的势垒。假如这个势垒被降低，反应就进行较快（速度表达式总是可以简化为速度控制步骤的速度常数乘以参加这一步正方向反应的物种的、根据逆反应的程度作了调整的浓度）。如果一个酶能降低速度控制步骤的势垒（例如，通过反应活性更大的官能团或结合位点较好的相对位置），它就变得更有效。但是，这必定有一个限度，因为当该步骤的势垒变得足够低时，另一步骤就将有较高的绝对势垒，而成为决定速度的步骤。然后这个步骤又将受到进化压力的支配，它将继续改进，直到又一个步骤取而代之。当所有步骤都有能量上（对热力学势垒作了校正）可相比的过渡态时，就达到这种改进的极限。就是说，每一步骤都是部分地速度控制的（一个例子见 O'Leary 和 Baughn, 1972）。对于溶液中的任何反应，最低的绝对势垒是扩散的势垒，因此，极限地最有效的孤离酶将是催化各自的势垒都等于扩散势垒的所有步骤的。

Albery 和 Knowles (1977) 根据任何单一酶催化反应的极限速度控制因素应当是扩散速度的假说，发展了一个描述酶效率的数学函数（多步代谢过程受到更多的约束，因为每一反应依赖于途径中其它一些反应的效率）。假如在酶促反应中一切化学过程都受到高度有效的催化，那么总反应将是受扩散限制的。这一概念的定量应用需要详细的数学资料，在 Albery 和 Knowles(1977) 的综述所引用的大量文章中已经给出。粗略的调查揭示，这个概念至今没有被广泛应用，很可能是由于还不知道关于酶反应各步的足够的细节。提供这种详细资料应当是今后研究的重要目标之一。

进行酶催化反应的底物必须能够无困难地到达和离开酶的活性位点。我们已经考虑到底物和产物的扩散速度终究决定催化的生产能力。如果要发生反应，几个反应物必须同时存在于活性位点；产物又必须在发生反应之后能够容易地逸去。一个对反应产物有强亲合力的酶可能使反应朝向扩散步骤前一步的过渡态'后退'。如果这一势垒比扩散的低,催化过程的效率会受到影响。

对于很有效的酶，或大的底物能在许多位点上强力与它相作用的酶,例如一些多肽酶和核酸酶,这可能是它们的催化作用中一个严重问题。酶能把亲合力问题变害为宝的一种方法是以生产性的方式用结合能来实现催化作用。一个结合得紧的产物将以小于扩散控制的最大值的速度被释放出来。但是，假如产物与酶相作用所得能量能用来使酶异构化到对产物有较小亲合力的形式，那么催化作用将被促进.不过,产物一经粘着到它具有亲合力的酶形式，它就封闭了发生变化的机会。应当在发生最后步骤之前进行异构化，以避免产物的封闭。在酶反应中共价中间体的生成可能有助于克服这个问题。

让我们考察一种在胃中消化的初期阶段水解大底物中肽键的胃蛋白酶。已经积累证据，提示反应是通过酶与肽键的两部分生成序列共价中间体而发生的［见在 Kluger 与 Chin（1982）和 Fersht（1977）中的讨论］。因为底物是大的，它们对酶有高的亲合力，产物的扩散离开必定是一个问题。假如生成序列共价中间体，那么中间体的生成提供使酶能发生异构化的能量。然后异构化了的酶能够容易地释放非共价结合的底物。

2.7 分子内催化的例子

为获得关于底物官能团与酶的催化基团之间相互作用性质的信息，最有效的方法之一是应用分子内的模型反应。我们对于酶催化基础特性的一般分析提示,在酶处理它的底物中,熵效应起了主要作用。相互作用的官能团预先彼此相互定位，使它们能够不

必先克服由于双分子反应中移动熵的损失造成的势垒而起反应. 许多不具有很高焓垒的相互作用被自身的熵垒所掩盖. 因此人们可能根据双分子模型的低反应活性错误地认为，某特定底物对一个酶活性位点上的官能团无反应性.

例如,依赖于 ATP 的生物素的羧化反应,一个很可能的机理是,生物素的脲基对 ATP 的末端磷酸根发生亲核进攻，产生 O-磷酸生物素 (Kluger 和 Adawadkar, 1976). 脲对磷酸官能团的反应过去是未知的，因为这两种官能团之间的双分子反应慢得观察不到. 但是,把两种官能团定位到一个分子上,使得它们相作用时不发生移动熵的损失，就可以克服上述问题. 我们发现脲与邻近的磷酸衍生物容易起反应，双分子反应的熵垒掩蔽了这两种官能团的可能的相互作用 (Kluger 等,1979). 因此,这个机理作为生物素酶促羧化一个重要可能性已被确立 (Wood 和 Barden, 1977)(图 2.7).

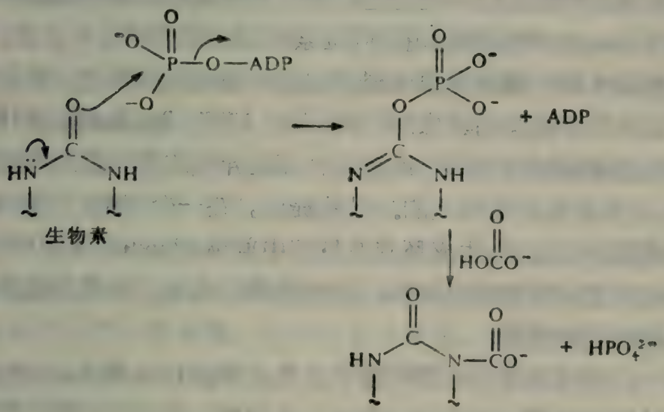


图 2.7 生物素经由生成磷酸化生物素的羧化反应
(见 Kluger 等,1979)

羧基衍生物也表现出强的邻近基团效应.例如,一个能与邻近羧基反应的酰胺被水解比孤立的酰胺快得多 (Bender, 1957). 酰胺先与羧基反应生成酸酐,同时释放酰胺中胺的那一部分(图2.8).

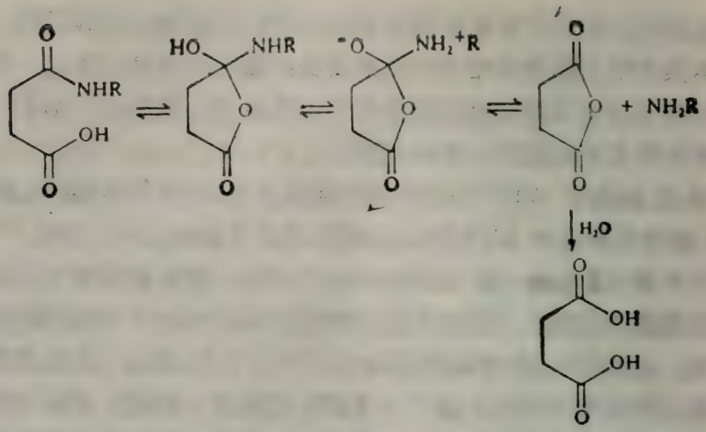


图 2.8 由酰胺邻近的羧酸的参与，通过生成酸酐来促进酰胺的水解

然后酸酐与水反应，产生从酰胺来的羧基，同时恢复原来存在的那个羧基.

最先用此机理进行研究的这一类化合物是邻氨基甲酰苯甲酸的衍生物.Bender 与同事应用了同位素标记和动力学分析方法.他们发现酰胺水解的催化是通过羧基加成到邻近的酰胺上，使分子内生成酰化的原酰胺而发生的（Bender, 1957; Bender等，1958). 分子中羧基未离解的形式，或者某种互变异构的等当形式都有反应活性，而共轭碱则是稳定的. 已经提出，在一个四中心反应中，羧基加成到酰胺基上，生成环式原酰胺中间体(Bender 等，1958)；这个中间体又分解为酸酐和胺. 这一途径的效率，关键是是否容易形成原酰胺中间体.

Kirby 与同事更详细地研究了这个反应(Kirby 和 Lancaster, 1972; Aldersley 等，1972). 通过一系列刚性的顺丁烯酰胺酸的取代衍生物，他们证明了基态应力通过加速环化明显地增加了反应速度，给出高达 10^{10} 的有效摩尔浓度. 他们还证明了，该中间体的生成比它分解为产物的步骤更快. 换言之，酰胺酸(1)转化为酸酐和胺是决定速度的中间体分解步骤.

2.8 过渡态类似体

在本章的开头我们谈到，关于反应机理的有机化学概念逻辑上应当适用于酶反应，但是我们也看到，由于必须考虑到重要而又巨大的酶分子，问题比在通常的有机反应中更为复杂. 由于酶比通常的底物大得多，它提供反应的环境，在一个完全的分析中，考虑反应中酶的历程与考虑底物的转变同样重要. 然而，追踪底物的结构变化比了解酶的构象变化容易得多. 因为酶是催化剂，它的结构在反应发生前后应当不变. 反之，底物则进行了将它转化为产物的一系列变化. 在反应前后对酶作考察显然得不到什么信息. 在反应之中观察酶是重要而且可能的，但通常也有困难. 简化这个工作的方法之一是应用一种能揭示与酶相互作用性质的底物来对酶加以监测. 光谱观察底物或经修饰的底物，时常给出这方面极其有用的信息（一个用现代光谱方法的例子见 Huber 等，1982）. 一个可供选择的途径是制备本身是底物变种的抑制剂，用它们与暂时性但在催化上重要的酶形式相互作用. 然后可以用光谱，或者像最近报告的，由产物分析（MacInnes 等，1982），从动力学上考察这抑制剂的效应. 让我们考察催化过程所包含的各个步骤，看看在哪一步可以应用这种途径.

包含单一底物转变为单一产物的酶催化反应为反应机理的分析提供了一个基础. 多底物的反应在单分子过程的基础上增加了必须对付的一些问题. 对于单分子转化，我们知道底物必须结合到酶上，在催化过程中转化为产物，然后再与酶分离开.

为了简化，我们可以假定，对于结合在酶活性位点的底物，由于结合的熵损失被底物与酶之间有利的相互作用所补偿而有余. 这种初始状态应当是这样的，即底物结构与结合前相比相对地没有改变，但是，为了进行反应，底物必须达到比过渡态结构更高的某种能量形式. 酶应当促进这一过程. Pauling 最初提出，酶通过采取能特别好地使过渡态稳定化的构象而能催化某一反应 [关于

这一点的讨论见 Wolfenden (1972)]. 假如酶能够把它的构象改变成对过渡态具高度亲合力的形式，那末，如果这种异构化就能量来说代价小于要达到的过渡态稳定化的数量，反应就将被催化.

因为过渡态出现在反应表面上最高能量点，它必然是一种不稳定的排列，因而无法将它分离. 然而，如果酶的目的是要将这个物种稳定化，酶对于它正要促进其形成的过渡态，在形式上应当是互补的. 假如我们能分离能使过渡态稳定化的酶的形式，那我们就有了过渡态的'负像'. 这种分析手段已被 Wolfenden (1972) 及 Lienhard (1973) 提出. 他们还认识到，酶将是作为结合底物和过渡态等多种形式的集合而存在. 酶-底物复合物的形成能提供使酶异构化到能稳化过渡态的形式所需的能量 [Jencks (1975) 曾把这称之为 Circe 效应，并对这一主题写了一篇广博而有分析的综述].

实验证据还暗示，与酶结合的比天然底物牢固得多的一些物种可能是因为它们很像反应的过渡态的缘故(Cardinale 和Abeles, 1968). 例如，被脯氨酸消旋酶所催化的 D-和 L-脯氨酸互相转化的过渡态应当与平面物种吡咯羧酸相像(图 2.9). 观察到吡咯羧酸与酶结合比两个底物中哪一个都牢固，这与它是酶所催化的相互转化的过渡态的结构类似体相一致 (Jencks, 1969, p. 300—301). Wolfenden (1972) 和 Lienhard (1973) 都认识到这除了是单一现象有用的特别解释之外，它还是分析过渡态结构，和设计抑制剂和药物的一个一般途径的基础 (见第五章和 Wolfenden, 1979).

这个途径一直对设计很特异的酶的抑制剂很有用，在综述文章中援引了许多实例. 但是，我们必须谨慎地认识到，我们是带着相当大的偏见来着手实验和解释的. 我们假设了由于一个分子与预期的反应过渡态相像就会发生牢固的结合，即令我们是对的，并且能排除争议中的其它过渡态，我们还确信我们是在客观地处理正当的因果关系；我们必须排除为什么类似体与酶彼此有高亲合力的一切其它可能的理由. 然而，由于我们并不能知道一切其它

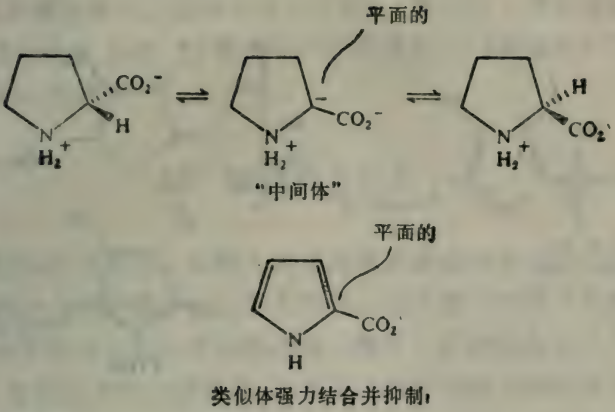


图 2.9 酶催化的 D-和 L-脯氨酸的互相转化，经由平面的过渡态，它可用吡咯-2-羧酸来模拟

可能理由究竟是什么，留给我们的实验证据最好也只能是提示性的而从不是结论性的.

作为机理的一个例子，让我们考察成功地设计的过渡态类似体的经典案例之一——丙酮酸脱氢酶催化丙酮酸的氧化脱羧反应. 脱羧的单一底物是丙酮酸，它与二磷酸硫胺素（TDP）在酶的活性位点上形成共价加合物（Kluger 和 Smyth, 1981). 在下一章中联系到仿生合成也讨论到这一反应. 脱羧反应的过渡态包含一个两性离子转化为电荷分离小得多的物种. 因此过渡态将最好地反映在一个结构中不包含起始加合物两性离子特点的分子中. Gutowski 和 Lienhard(1976)推论，二磷酸硫胺素噻吖酮(TTDP)就其电荷分布来说与脱羧过程的过渡态相象(图 2.10).

与所预期的相符，发现 TTDP 很牢固地结合到丙酮酸脱氢酶上，比二磷酸硫胺素或丙酮酸牢固得多，或许因为它是一个过渡态类似体. 但是，像我们在前面所讨论到的，也可能有其它未预料到的因素使它牢固地结合. 例如，这个酶和别的依赖 TDP 的酶的 TDP-结合位点看来有低的极性，因而不是两性离子的那些 TDP 类似体一般都很好地结合到 TDP-结合位点上. 例如，二磷酸脱

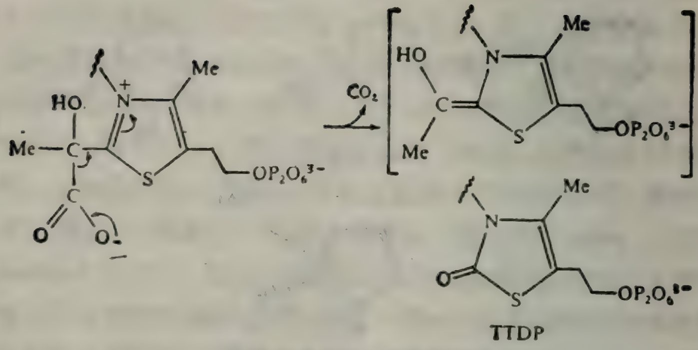
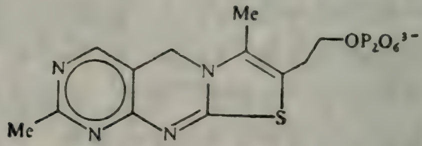


图 2.10 TDP 的丙酮酸加合物的转化包含一个过渡态，它很可能具有与失去 CO_2 后生成的中性烯胺相联系的特性. TTDP 是这个烯胺的类似体

氢硫胺素(2.6)是一个三环平面分子，它并不是 TDP 或过渡态的接近的结构类似体，但还是很好地结合到丙酮酸脱羧酶的 TDP-结合位点上（Wittorf 和 Gubler, 1970).



(2.6)

辨别过渡态与反应活性中间体也是困难的，因为它们在能量和结构上可能相接近（Hammond 假设). 因此，“过渡态类似体”这个词时常被较为保守的“反应活性中间体类似体”所代替(Byers, 1978). 然而，由于两类型的物种应当彼此相象，为了分析的目的，差别是不大的. Wolfenden (1974)曾提议，如果作为生成过渡态的结果，酶发生异构化，一个过渡态类似体可能不结合到酶上. 底物必须与酶结合，然后一同变到过渡态. 酶单独地不异构化，因而无底物存在时就不存在能识别过渡态类似体的酶形式.

只要考虑到方法的这些限制，在阐明酶机理和设计抑制剂中,过渡态类似体可以是很有用的工具. 通过用光谱法观察一个酶——类似体复合物，有潜在的可能观察到专门对催化起作用的那个酶形式的结构.

2.9 多重结合位点

在酶催化过程中，底物上的反应位点往往是大分子上的一小部分. 酶对小分子的亲合力是有限的，因为酶与底物之间的吸引作用依赖于小分子每个结构组分对与酶结合贡献的总和（Jencks. 1975）. 底物分子越大越复杂,就越可能存在能量上与酶有利地相互作用的位点.

底物的某些部分与酶的相互作用主要是基于热函,包括氢键、静电吸引、偶极排列和非极性溶剂排斥等.

一些有机辅酶为具有许多能有利地与酶相作用的位点的分子提供了实例（Bruice 和 Benkovic（1966),第 2 卷）. 可能它们在进化中的成功,部分地是由于有多位点与所缔合的蛋白质相作用. 例如烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸含有能与它们所结合的酶上一些阳离子位点发生大大有利的静电相互作用的磷酸基. 此外，辅酶的核糖基部分含有羟基，能与受体位点形成氢键. 其它辅酶，如 FAD 和硫胺素二磷酸中类似的核苷酸样的单元也能帮助结合(Metzler（1977),第八章).

底物与结合在酶上的硫胺素二磷酸的结合作用是说明问题的. 硫胺素二磷酸非共价地结合到脱辅酶蛋白上，这种缔合有相当高的亲合力（Krampitz, 1970）. 在丙酮酸脱羧酶的情况，底物丙酮酸和产物乙醛都是小分子，对于与酶的催化位点有利的热函相互作用（enthalpic interaction）作不了多少贡献. 在酶的催化循环当中,硫胺素二磷酸与丙酮酸相结合,生成加合物乳酰硫胺素二磷酸，它再把二氧化碳换成质子，产生烃乙基硫胺素二磷酸(Kluger,1982). 这个产物分解为乙醛和硫胺素二磷酸(Krampitz

等，1961）．硫胺素二磷酸分子仍然与脱辅酶蛋白缔合，而乙醛被释放到溶液中．在催化的历程中，小而又结合弱的丙酮酸被转化为较大的乳酰硫胺素二磷酸分子的一个片段，因此硫胺素二磷酸与丙酮酸之间形成这个加合物是这一催化循环的关键步骤．

在本章中强调了催化作用中结合的重要性，因而我们可能预料乳酰硫胺素二磷酸的形成会是一个增加酶与丙酮酸之间亲合力的过程．但是，现已积累证据，说明加合物并不改进丙酮酸对酶的亲合力（Kluger 和 Smyth，1981）．事实上，它有比硫胺素二磷酸本身明显低的亲合力．那么，形成加合物在催化上的有利之点何在呢？加合物提供了一个通向脱羧过程过渡态的途径，如我们已指出的，这过渡态更像一个中性的噻唑(Breslow，1962；Gutowski 和 Lienhard，1976)，显然，假如这个酶对一个中性噻唑有高亲合力，它就不能同时对两性离子的乳酰硫胺素也有高亲合力．得到这一值得注意的情形的实验证据如下．

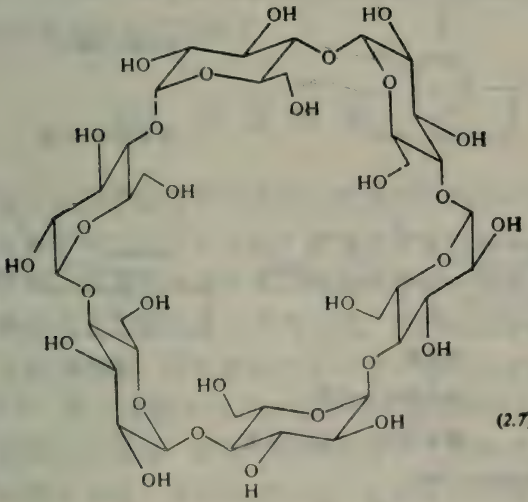
小麦胚丙酮酸脱羧酶的脱辅酶蛋白对乳酰硫胺素二磷酸加合物的亲合力必定很低（Kluger 和 Smyth，1981），因为我们检测不出高于对照水平的加合物对酶的活化．但是，乳酰硫胺素二磷酸的叔丁酯与酶结合并使它活化，K_m 大约是硫胺素二磷酸的两倍．因此，这些亲合力测定并不反映对丙酮酸酯基大小的立体敏感性． 假如硫胺素二磷酸起到高亲合力的“锚系”作用（Jencks，1975），那么乳酰硫胺素二磷酸相对于未取代物种的亲合力降低，指明乳酰基对脱辅酶蛋白有负的亲合力．因为酯能结合，这说明负效应是由于乳酰硫胺素二磷酸上一个未酯化羧基的存在．

2.10 仿生化学

获得至此我们已讨论的一些原理，一个逻辑的引伸是把它们应用到新的情况． 假如我们能用化学的语言解释一个酶如何工作，那么我们将能设计一些从我们对酶的知识可以预见它们性质的其它化学催化剂．Breslow造了一个新词“仿生化学”(biomimetic

chemistry）来包括目的在于设计和构成作为催化剂性质可与酶匹敌的分子这样一个领域的各个方面［一篇最近综述见 Tabushi (1982)]．设计一些分子，具有可预见的象酶一样的特性，即对底物有高的亲合力，有效而特异的催化剂，已成为很风行的研究活动．下面我们将举例说明以提高催化效率为目的的催化剂设计中的某些进展．第四章中将讨论为了合成上应用而设计的一些催化剂．

从事仿生化学研究的物理有机化学家，一个主要努力是制作"模拟酶".他们的目标是通过合理设计制成真正的、有效而特异性的催化剂．通常，已被采取的途径包括将某种天然存在的，对所期望的底物有一定结合能力的物种加以转化．例如，由淀粉的微生物降解可得到一系列葡萄糖的环式(1-4α）低聚糖*，Schardinger



(2.7)

环糊精，包括含6，7或8个葡萄糖残基的品种，分别称为 α-，β-或γ-环糊精．不指明环大小时统称为环糊精．它们的结构已被仔细研究，一般呈花环形(或炸面圈形)．葡萄糖单元的亲水羟基指向

* 此处原文有误，现已改正．——译者注

溶液，而C—H和C—O—C基团朝向内腔(2.7)。非极性分子对环糊精的内腔有一定亲合力，能形成稳定的络合物. 对作成以环糊精分子为基础的催化剂已作了相当多的努力(Tabushi, 1982).

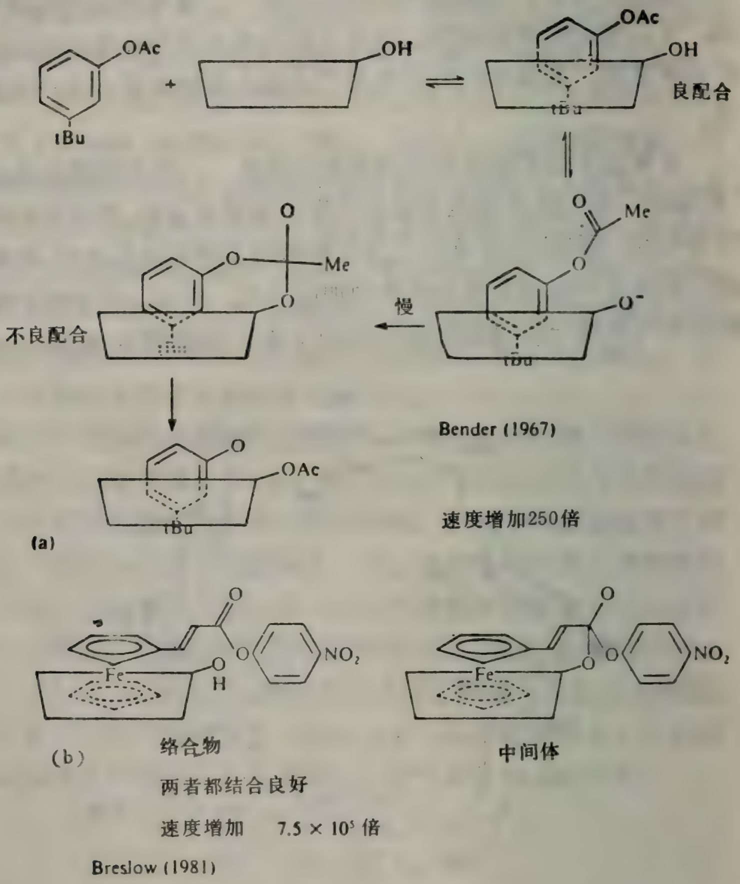


图 2.11 (a)环糊精促进间位叔丁基苯基乙酸酯的水解，但立体化学问题妨碍了最高效率；(b)设计在过渡态很好配合环糊精内腔的分子，发生更快的反应

用环糊精催化的早期例子通常包含环糊精的羟基与底物上不饱和亲电中心的反应。譬如 Bender 发现环糊精被间位叔丁苯基

乙酸酯酰化，反应速度常数是水解速度常数的 250 倍（van Etten 等,1967)[图 2.11(a)]. 虽然这是明显地加速,但还不是对一个酶催化过程所预期的典型的 k_{cat} 的加速. Breslow 与同事（Breslow 等，1980）仔细分析环糊精和底物的结构特点，并试图对催化体系设计改进. 他们发现 Bender 所研究的反应被减慢，是因为底物虽然被有效地结合在环糊精腔穴中，但水解的中间体倾向于离开腔穴. 为了防止中间体离开腔穴,对环糊精作了修饰,横过腔穴的一面加上了合成的盖帽部分. 此外，又发现了一些较好地配合腔穴,因而离开的倾向较小的底物. 在考察分子模型之后,得出结论认为二茂铁应当特别好地与环糊精结合，以致由二茂铁衍生的一些酯应当是优良的底物. 这导致了催化速度常数比 Bender 与同事观察到的再提高 1000 倍[图 2.11(b)]. 净收结果是 3-反式-二茂铁基-丙烯酸的对硝基苯基酯的水解被环糊精加速了百万倍,这是可以与酶相比拟的加速了.

2.11 展望将来

仿生化学中的改进应当伴随按反应机理阐明酶催化过程方面的发展. 也应当考虑到在反应中整个蛋白质催化剂的运动，而不仅仅是活性位点. 这是一个非常难以解决的问题，因为要得到大分子运动的具体信息几乎没有可用的方法. 我们知道，蛋白质远不只是活性位点的容器，活性位点也不只是一些不活动的官能团集合的“帽架子”.蛋白质链最引人注目的特色是它相对的挠曲性. 很可能蛋白质链柔性弯曲，顺着一系列对应于反应序列的每一步产生的能量的低谷前进，从而促进反应. 这种柔曲的作用在迄今已制备的一些模拟酶中是缺乏的. 其结果，经修饰来作为催化剂的分子的本性限制了它的特异性和催化作用.

我们已经看到,了解了酶催化中包含的某些中心问题,便可以成功地应用物理有机化学的原理来研究. 纵然按某些简单有机反应的水准对酶在机理细节上还没有了解，但我们确实对许多酶反

应比对许多有机反应所知更多. 酶以远远比在非催化体系中所可能的更为特异的方式引导底物的方向. 因此，物理有机化学的一些技法能够以富有成果的方式应用到酶反应中.

底物与酶的相互作用依然是现代有机化学中最富魅力的机理问题之一. 然而我们的知识还很有限. 很可怀疑，即使最有成就的有机化学家,能够考察一个功能未被揭示的酶的三维结构,并预测这个酶能有效地催化的反应. 设计那些对有用的反应具催化性质的分子是正在研究的目标，迄今已得到尽管有限但很有意义的成功. 我们希望这一章所作的综览将帮助不熟悉这一领域的读者领会酶化学对其它化学领域的影响.

第三章　辅酶催化的化学模型

Seiji Shinkai

(Department of Industrial Chemistry,
Nagasaki University, Nagasaki, Japan)

3.1 引　　言

酶在自然界漫长的年代中经历反复的“尝试与失败”之后诞生。酶活性部位的演化，使它能在环境条件下作为媒介，调节生物反应，因而成为优良的生物“催化剂”。然而，按有机化学家的观点，酶有两个不可避免的限制因素：其一，酶催化反应往往过于专一，且不容许进行有机体不需要的反应，其二，只在环境生理条件下表现催化活性。尽管可以用酶催化完成许多有用的合成反应（见第四章），但反应条件和酶的专一性限制了酶的直接应用。因此，人们只得在更简化的体系中模拟酶催化反应的实质，以便以多种方式应用类酶催化反应。这就是酶模型研究的目的。我们认为酶模型研究包括两个主要目标：其一，开发有多种用途的类酶催化剂；其二，在更简化的体系中阐明反应机理。

本章具体涉及到的辅酶是许多酶中的辅基，通过共价键或次（化）合价力结合在它们的脱辅酶蛋白上。重要的是，绝大多数辅酶甚至在没有脱辅酶蛋白的情况下也能催化反应，但作用很弱。如前章所述，脱辅酶蛋白在辅酶催化过程中具有增强反应性和控制立体选择性的作用。因此，如能用“人工脱辅酶蛋白”控制辅酶反应性和立体选择性，将是有价值和实用的酶模型催化剂。

本章展示许多辅酶催化体系用于有机化学的尝试，由于其他生物有机化学家已作过评述，将不涉及辅酶催化的详细机理（Jen-

cks, 1969; Bruice 和 Benkovic, 1966). 本综述是大量辅酶化学的第一个综合性报道.

3.2 辅酶烟酰胺的模型研究

烟酰胺-腺嘌呤二核苷酸及其还原型 (NAD^+ 和 NADH) 作为辅酶存在于大量酶氧化-还原反应中 (图 3.1). 依赖于 NADH 的酶有脱氢酶、氢转移酶、硫辛酰胺脱氢酶、磷酸化酶以及氧化酶. 虽然酶的机理并不简单, 但从模型研究来看, 可以将这些反应简化为通过底物与吡啶阳离子或与烟酰胺部分的 1, 4-二氢吡啶间氢交换来进行. 依赖于 NADH 的酶的基本特点可以概括如下: (i)反应以三元(脱辅酶蛋白-辅酶-底物)复合物形式进行, (ii)直接进行氢转移,明显地不涉及与溶剂的质子交换,(iii)对于辅酶与底物,反应都是立体特异性的. 这些特征目标对于 NADH 化学模型的研究曾经是一个很大的挑战. 由于 NADH 或 (NAD^+) 的二氢烟酰胺部分承担氧化还原反应,因此可以用简单 *N*-取代(如: R ═ 正丙基,苯基等)的 1,4-二氢烟酰胺(*3.1*)作模型研究. Hantzsch 酯(*3.2*)由于制备方便也用于模型研究.

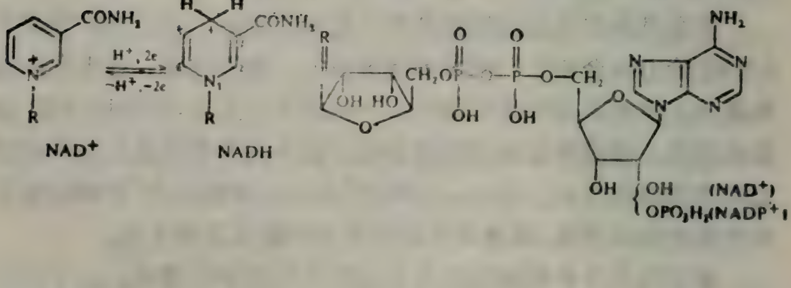
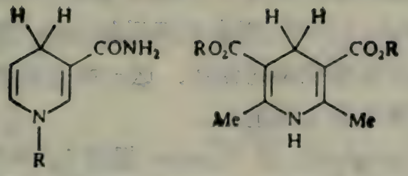


图 3.1



(3.1)　　　　(3.2)

3.2.1 金属离子催化作用

醇脱氢酶是一个最有代表性的 NADH-辅佐酶*，一直是仿生 NADH 化学研究的典型对象．醇脱氢酶能还原多种不同结构的醛（Jones 和 Beck，1976），相比之下，NADH 模型化合物只能还原最活化的羰基底物，如六氯丙酮、三氟苯乙酮、四氯苯醌等．这一事实使我们难于从模型反应作出机理方面的结论（Bruice 和 Benkovic，1966；Kill 和 Widdowson，1978；Sigman 等，1978；Dittmer 和 Fouty，1964；Steffens 和 Chipman，1971）．

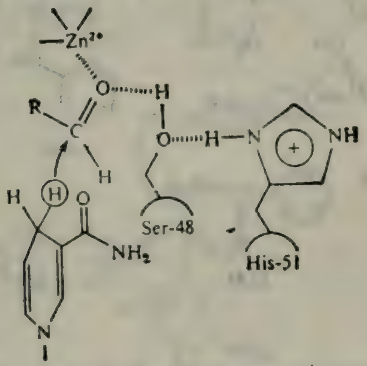
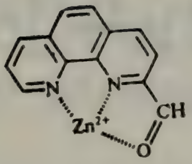


图 3.2　醇脱氢酶的三元复合物

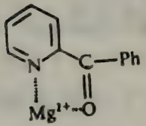
* 为行文方便，依赖于 NADH 的酶有时译为 NADH 辅佐酶，即以 NADH 为辅酶的酶．——译者注

已知在醇脱氢酶的活性部位含有锌，它在作用机理中起决定作用. Pattison 和 Dunn (1976) 提出在三元复合物(图 3.2)的还原过程中，锌离子起亲电催化剂的作用. 这一概念对达成非活化羰基底物的仿生还原是非常有帮助的.

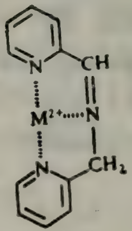
1971 年 Creighton 和 Sigman 报道 1,10-二氮杂菲-2-甲醛(*3.3*)能在锌离子存在下被(*3.1*)还原. 这可能是金属参与 NADH 模型还原羰基的首例. 此后的研究表明，在各种双键 (C=O,C=N,C=C 等)的还原反应中，金属的催化作用确实是多方面的：如(*3.4*)—(*3.8*)在乙腈中，金属离子［主要是 $Mg(ClO_4)_2$］存在下被 NADH 模型化合物还原 (Gase 等,1976; Gase 和 Pandit,1977; Shinkai 等,1979a; Ohnishi 等,1975a; Ohno 等,1980).



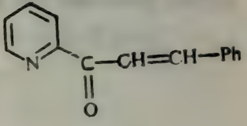
(3.3)



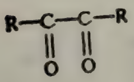
(3.4)



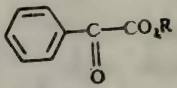
(3.5)



(3.6)

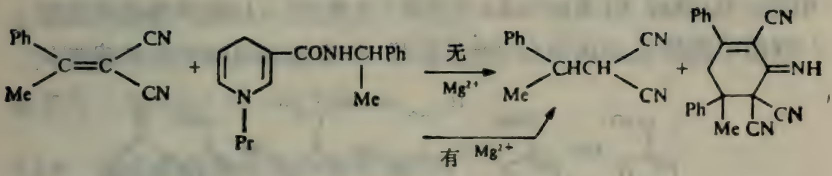


(3.7)



(3.8)

加入的金属离子有时能改变反应途径. Ohnishi 等人(1976)发现，无 Mg^{2+} 时(*3.10*)还原(*3.9*) 同时生成(*3.11*)和(*3.12*)，而有 Mg^{2+}时只有(*3.11*)生成(图 3.3). 因为(*3.12*)可能是由一个自由基中间体的二聚作用而产生的，他们认为 Mg^{2+}抑制 1,4-二氢烟酰胺的自由基性质.



(3.9)　　(3.10)　　(3.11)　　(3.12)

图 3.3

3.2.2 质子酸催化作用

已知在D-甘油醛-3-磷酸脱氢酶和乳酸脱氢酶（NADH-辅佐酶)的活性部位，由组氨酸残基的咪唑基代替了锌的功能. X射线晶体研究（Adams 等，1973；Moras 等，1975）表明，质子化的咪唑基在还原过程中起一般酸的作用(图 3.4). 此发现意味着，除Zn^{2+}，Mg^{2+}这样的路易斯酸之外，质子酸在 NADH 模型还原反应中也将是有用的亲电催化剂. 曾报道在(*3.13*)—(*3.16*)式中，连接在芳环上的双键 C=O，C=S，C=N，在被二氢烟酰胺还原的反应过程中，邻羟基起决定作用(Pandit 和 Mas Cabré，1971；Shinkai 和 Bruice，1973a；Shinkai 等，1976a；Abeles 等，1957). 与此

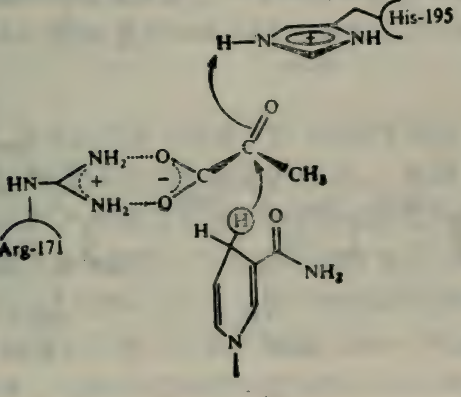
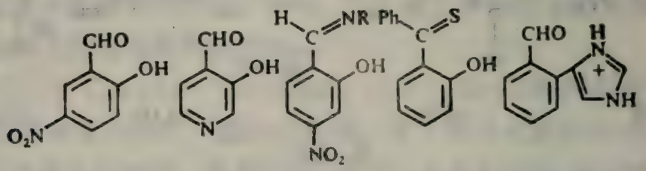


图 3.4　X射线晶体研究提出的乳酸脱氢酶三元复合物
Adams 等，1973)

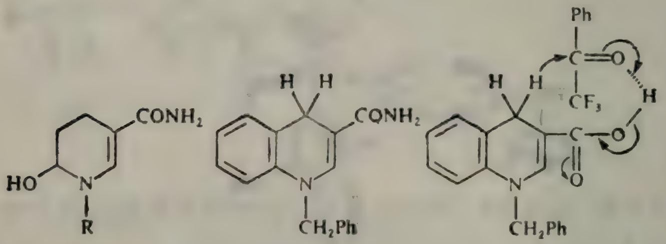
相似，Shinkai 和 Kunitake (1977) 注意到(*3.1*)能很容易地还原(*3.17*)中的醛基．这些与 D-甘油醛 3-磷酸脱氢酶有关的模型体



(*3.13*) (*3.14*) (*3.15*) (*3.16*) (*3.17*)

系的研究，证明了与底物反应中心形成氢键的重要性．Van Eikeren 与 Grier (1976) 发现(3.1；R=*n*-苯基)还原三氟苯乙酮的速度在质子溶剂中明显地高于非质子溶剂．加入痕量质子酸能促进 NADH 模型的还原反应也已清楚 (Shinkai 和 Kunitake，1977；Wallenfels等，1973)．上述结果都支持了这样一种观点，即NADH模型还原反应的过渡态在质子或酸性介质中被有利地稳定化了．

此处应注意到一个疑难之点，传统的 NADH 模型化合物在酸性介质中迅速地分解为 1,4,5,6-四氢烟酰胺衍生物(*3.18*)．因此，在酸存在下的还原反应总是伴随有NADH 模型化合物的酸催化分解．为防止这一不希望的分解反应发生，合成了新的NADH模型化合物(*3.19*)，用芳环保护 1,4-二氢烟酰胺中对酸敏感的 5,6-双键，发现(*3.19*)在乙酸中比 (*3.1*；R=苯基)稳定 3.0×10^3 倍．用



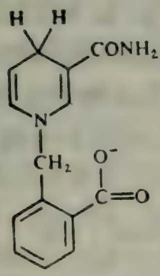
(*3.18*) (*3.19*) (*3.20*)

此对酸稳定的 NADH 模型，能在强酸 (HCl，苯磺酸)存在下还原非活化羰基底物(苯甲醛、环己酮等)，α-酮酸和 α-亚氨基酸(产物

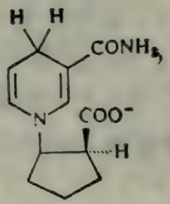
是 α-氨基酸）（Shinkai 等,1979c,1979d, 1980a）．此外,还合成了对酸稳定的 NADH 模型(*3.20*),借助于分子内酸的作用还原羰基底物（Shinkai 等,1979e）.

3.2.3 通过非共价相互作用的催化

Hadju 和 Sigman (1975) 指出,具有邻近羧基的二氢烟酰胺(*3.21*) 在非水溶液中还原 *N*-甲基吖啶离子比没有羧基的同系衍生物快几个数量级．例如，在乙腈中（*3.21*）相对于其甲酯表现出 100 倍的加速作用．(*3.22*) 的特点是有一个构象非柔性的羧基,表现出更大的加速作用（10^3 倍）（Hadju 和 Sigman，1977）．这种加速作用，很可能反映还原反应途径中烟酰胺氮上出现的正电荷的静电稳定化作用、

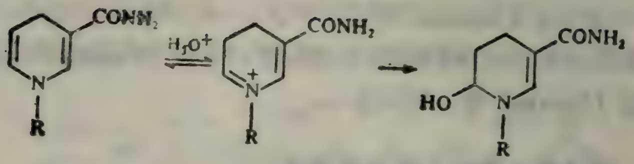


(*3.21*)



(*3.22*)

可以预期，结合到阴离子胶束上的 NADH 模型化合物(*3.1*：R=正十二烷基）有类似的静电稳定化作用．但据 Shinkai 等(1978b)报道,对于 *N*-甲基吖啶离子和异咯嗪的还原反应,阴离子胶束使速度常数的增大幅度小于分子内的模型化合物（*3.21*）和(*3.22*).另一方面,(*3.1*;R=正十二烷基)的酸催化分解明显地被阴离子胶束加速,而受到阳离子胶束的抑制(Shinkai 等,1975,1976b;Bunton 等,1978)．阴离子胶束的加速作用,可以合理地解释为胶束电荷和胶束表面 H_3O^+ 浓度对带正电荷的中间体(*3.23*)的静电稳定化作用(图 3.5)．

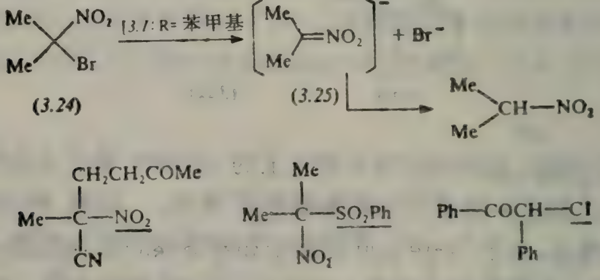


(3.23)　　(3.18)

图 3.5

3.2.4 作为电子给体的 NADH 模型

NADH 模型化合物通常借助于金属离子或质子酸向底物转移氢负离子(或其等当物)(MacInnes 等,1982). 另一方面,对于具有单电子受体特点的底物,如 $Fe(CN)_6^{3-}$ 和氯高铁血红素,则表现为分步单电子给体(Kill 和 Widdowson,1978). 已知在 NADH 模型化合物存在下,适宜的离去基(如 NO_2^-,Cl^-,Br^-,$PhSO_2^-$等)容易从 sp^{3-}碳消去 (Kill 和Widdowson, 1976; Ono 等, 1980, 1981; Inoue 等, 1974). 例如(*3.24*)经自由基中间体(*3.25*)还原脱溴(图 3.6). 类似地,在(*3.26*)—(*3.28*)中离去基(划线标明)被



(3.24)　(3.25)　(3.26)　(3.27)　(3.28)

图 3.6

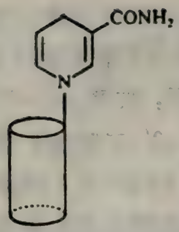
氢还原取代. 认为反应是经由烟酰胺自由基阳离子,从 NADH模型化合物的单电子转移进行的. 这些反应很类似于包含单电子转移后阴离子基团消去的 S_{RN}-型反应.

在加热下不能进行的 NADH 模型还原反应有时能通过光辐射实现．例如马来酸或富马酸二甲酯被（*3.1*;R═苯甲基）或（*3.2*）在光辐射（>350nm）下还原为丁二酸二甲酯，收率 60—70%（Ohnishi 等，1975b）．在 $Ru(bpy)_3^{2+}$（bpy = 2,2'-二吡啶）存在下能容易地进行 C═C 双键进一步的还原反应（Pac 等，1981）．NADH 模型化合物的光活化反应可能与激发态容易发生单电子转移有关．

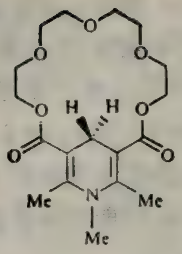
3.2.5 连接在主体分子上的 NADH 模型

在第二章中曾评述涉及环糊精主-客体络合物的仿生催化作用，带有功能基的主体分子在许多情况下模拟酶催化作用的基本功能（Shinkai，1982）．主体分子结合底物形成相应的 Michaelis 复合物，如曾讨论过的，此复合物是酶催化反应高活性和选择性的根源．例如，已合成带有 NADH 模型功能的 β-环糊精（*3.29*）（Kojima 等，1981），它还原茚三酮的速度比 NADH 大（约 40 倍），而且反应按 Michaelis-Menten 饱和动力学方程进行．Van Bergen 与 Kellog（1977）合成了冠醚 NADH 模拟化合物（*3.30*），以相对于（*3.2*）2700 倍的速度将锍正离子 $R^1COCH_2S^+R^2(CH_3)$ 还原为 R^2SCH_3．另一方面，$NaClO_4$ 有效地猝灭其活性．由于锍正离子与冠醚环的互相作用，使速度明显提高而 Na^+ 与冠醚环的竞争结合产生了抑制作用．此现象提醒我们联想起酶化学中的竞争抑制作用．Murakami 等（1981a,b）研究了将 NADH 模型固定到环番结构（*3.31*）上时的反应性．

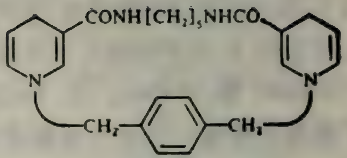
Behr 和 Lehn（1978）报道了更具特色的 NADH 模型催化剂的设计．如在（*3.32*）中所表示的，催化剂通过冠醚部分与底物铵离子的相互作用与底物相结合并发生由二氢吡啶到3-乙酰基吡啶阳离子的分子内氢转移． 在下一章中将看到主-客体化学在合成中应用的例子．



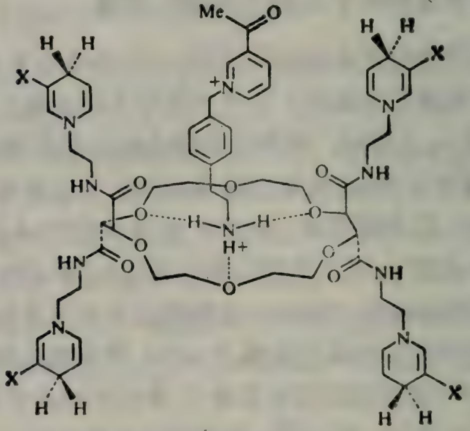
(3.29)



(3.30)



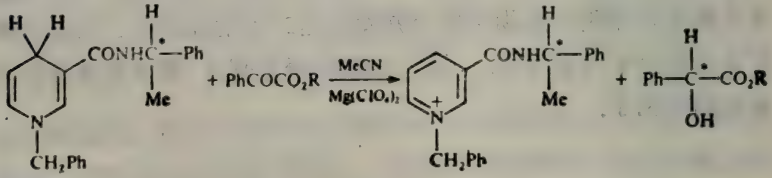
(3.31)



(3.32)

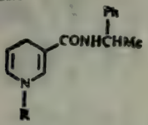
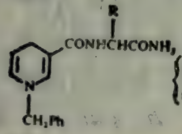
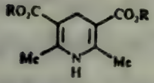
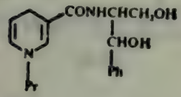
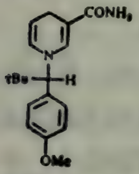
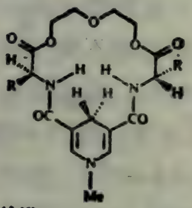
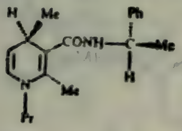
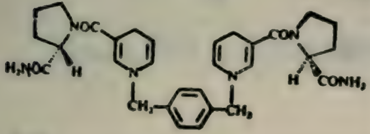
3.2.6 NADH 模型化合物的不对称还原反应

依赖于 NADH 的酶值得注意的特点之一是立体专一性的氢转移，本章首次涉及合成化学家最感兴趣的不对称还原反应(见第四章)。Ohnishi 等 (1975c) 首次报道用 NADH 模型化合物模



(3.34) 图 3.7 (3.33)

表 3.1 苯甲酰甲酸酯不对称还原的光学产率

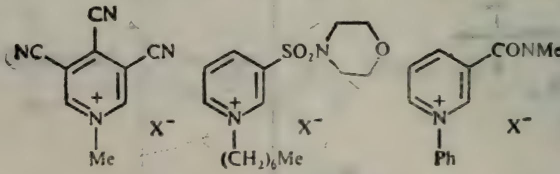
催化剂	光学产率(%)	参考文献
 (3.34)	11—20	Ohniski 等 (1975c)
 R = Me; R = CH_2CHMe_2; R = CH_2Ph (3.35)	47 26 5	Endo 等(1977)
 R = (-)- 蓋基 (3.36)	17—21	Nishiyama 等(1976)
 (3.37)	26.3	Makino 等(1979)
 (3.38)	27	Van Ramesdonk 等(1978)
 (3.39)	86	de Vries 和 Kellog (1979)
 (3.40)	94.7—97.6	Ohno 等(1979)
 (3.41)	93—98	Seki 等(1981)

拟羰基底物的不对称还原反应.在(*3.1*)的 3-酰氨基处引入手性α-苯乙胺，在 Mg^{2+} 离子存在下将苯甲酰甲酸酯还原为苯乙醇酸酯(*3.33*)(图 3.7)．(*3.33*)的构象与 3-酰氨基相同，光学产率为 11—20%．

此后人们曾付出相当大的努力以提高光学产率，表 3.1 中列出具有代表性的研究结果．最后三例由于对映体选择性相当高，特别引人注目．在(*3.39*)中释放一个氢的 4 位被不对称的冠醚环覆盖，使得在过渡态中底物的取向受到高度控制．在(*3.40*)中，用来进行还原反应的氢直接连在不对称碳上．在(*3.41*)中，Mg^{2+}桥联的环状结构可能是活性物种．(*3.39*)与(*3.41*)的氧化式用连二硫酸钠还原，可重复使用，而(*3.40*)由于还原得到外消旋化合物不能再利用．上述各例证明，在活体外 NADH 模型还原反应的对映体选择性，目前可与在酶体系中一样高．

3.2.7 NAD⁺模型化合物的催化氧化反应

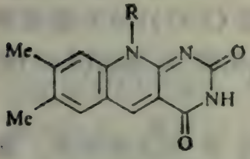
在醇脱氢酶中，醛(酮)与醇的互相转化和 NADH 与 NAD⁺ 辅酶的互相转化偶联．NADH 模型催化底物羰基的还原反应的例子很多，而关于 NAD⁺ 模型氧化底物醇的例子则相当少．Wallenfels 与 Hanstein (1965) 指出，(*3.42*)能将 9-芴醇氧化为9-芴酮(产率 8%)．Shirra 与 Suckling (1977) 曾研究用不同的吡啶盐使苯甲醇盐氧化成为苯甲醛的反应 [例如(*3.43*)]，但没有充分进行产物的分析．最近，Ohnishi 与 Kitami (1978) 用(*3.44*)进行苄醇锂的氧化反应，1,4- 二氢吡啶的产率是 3.5—28%．这些不令人满意的结果说明，*N*-取代的吡啶离子(通常的 NAD⁺模型化



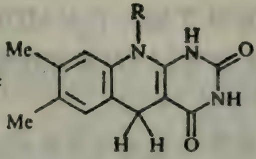
(*3.42*)　(*3.43*)　(*3.44*)

合物)模拟 NAD⁺辅佐的氧化反应是有欠缺的，氧化反应的模型研究经历着意料之外的过程.

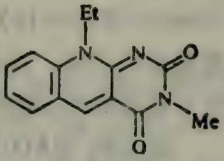
5-脱氮黄素(*3.45*)[及其还原型(*3.46*)]最初是作为黄素辅酶类似物而合成的. (O'Brien 等,1970; Edmondson 等,1972). 但随后的研究表明，5-脱氮黄素的氧化还原行为不是与黄素辅酶而是与 NAD⁺极相似 (Hemmerich 等,1977). 令人惊奇的是,后来发现 5-脱氮黄素的基本骨架竟包含在甲烷菌的荧光辅因子 F_{420}中 (Cheeseman 等,1972).



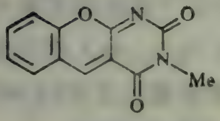
(*3.45*)



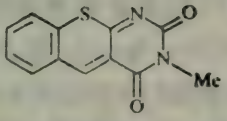
(*3.46*)



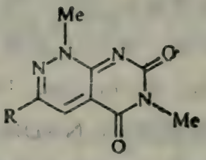
(*3.47*)



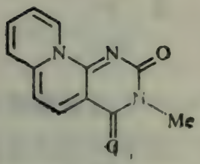
(*3.48*)



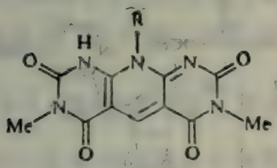
(*3.49*)



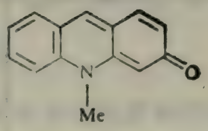
(*3.50*)



(*3.51*)



(*3.52*)



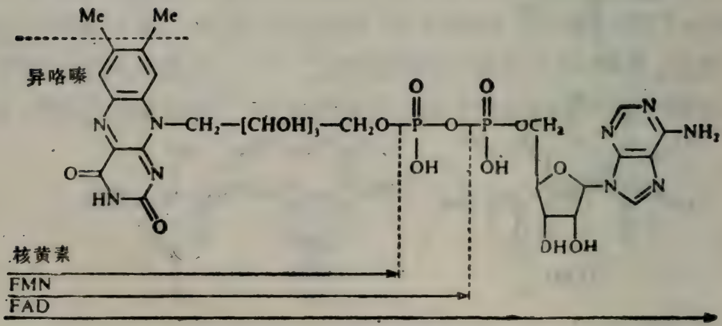
(*3.53*)

Yoneda 等人(1977)发现(*3.47*)在碱性条件下能氧化醇类，醛

与酮的收率是 82—99%. 此结果表明，5-脱氮黄素的骨架适宜于模拟酶中的 NAD^+.随后又证明，修饰的辅酶模型 (*3.48*)—(*3.51*) 也能氧化醇 (Yoneda 和 Nakagawa, 1980; Yoneda 等, 1978a, 1980a,b). 化合物(*3.48*) 由于环系中氧的电负性表现出很强的氧化能力，且在无碱情况下能氧化苄醇. 每克分子杂环化物的氧化产物收率在供氧条件下常常超过 100%， 这是因为还原型重新又被氧分子再氧化的缘故. Yoneda 等(1981)合成了(*3.52*)，由于其还原型对分子氧相当敏感，可以作为一个优良的再循环氧化剂. Shinkai 等(1981a)设计了另一个 NAD^+模型 (*3.53*)，与 5-脱氮黄素是等电子体. 我们发现(*3.53*)能有效地氧化醇，还原的(*3.53*)被分子氧再氧化，周转数是 18—22.

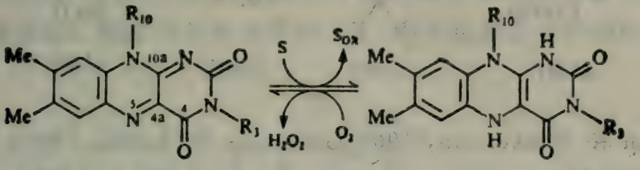
成功的 NAD^+模型氧化剂均含有相应的 *N*-烷基吡啶环，借助于多环体系中的一些吸电子基团而具有亲电性. 简单的 NAD^+模型有较好的功效，可归因于这些结构特点. 某些模型氧化剂也有还原性，例如还原的 5-脱氮黄素在酸存在下能将醛还原为醇 (Shinkai 和 Bruice, 1973b; Yoneda 等, 1978b). 令人感兴趣的是，对酸稳定的 NADH 模型(*3.19*)的基本骨架竟包含在(*3.46*)之中. 表明(*3.46*)的还原能力与对酸的稳定性是相关联的.

3.3 黄素的催化作用



黄素辅酶 (FAD, FMN 与核黄素)能氧化多种多样的底物，如

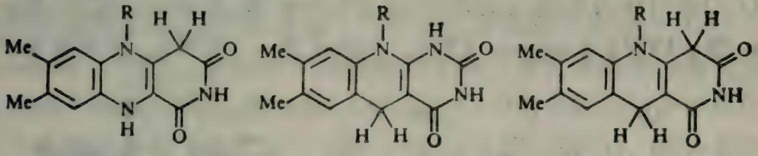
氨基酸、羟基酸、胺类等等，在生物体系中辅酶本身被分子氧再氧化（Hemmerich 等，1970；Walsh，1980；Bruice，1980）（图 3.8）.从化学观点看，黄素的氧化能力可能来自 4-4a-10a 链节处吸电子



(3.54)　　　　(3.55)

图　3.8

的类似三酮的结构，它可与刚刚讨论过的活性 NAD^+ 氧化剂模拟物相比拟．简单的 α,β,γ-三酮如四氧嘧啶和茚三酮，在水溶液中由于中心羰基的易水合而失去氧化能力．相反，黄素的类三酮结构不进行水合作用，因而保留较强的缺电子性质．Walsh（1978）与 Spencer（1977）等用碳原子依次取代黄素中氮原子的方法研

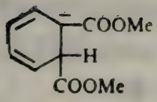


(3.56)　　　　(3.57)　　　　(3.58)

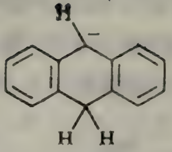
究氮原子在其中的重要作用．发现 1-脱氮类似物（*3.56*）对氧的敏感性与天然黄素（*3.55*）一样，但 5-脱氮类似物（*3.57*）和（*3.58*）则不能（或几乎不能）被氧再氧化．这一发现暗示还原型黄素对氧的敏感性与 5,10-烯二胺结构有关．

3.3.1　黄素作为氧化催化剂

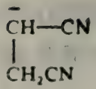
黄素辅酶在许多生物体系中充当多种用途的氧化催化剂，但与 NAD^+ 模型体系类似，在生物体外，黄素分子对于相对富电子的底物也只有很小的氧化能力．已知黄素和异咯嗪能氧化（*3.1*），（*3.2*）那样的二氢吡啶，并能氧化脂肪族硫醇和二硫醇成二硫化物



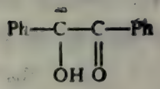
(3.59)



(3.60)



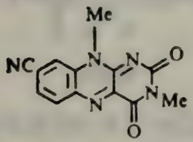
(3.61)



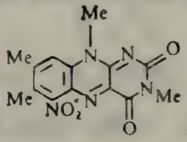
(3.62)

(Gibian 和 Winkelman, 1969;Gascoigne 和 Radda, 1967; Gumbley 和 Main, 1976; Loechler 和 Hollocher, 1975), 以及(*3.59*)—(*3.62*)那样的碳阴离子 Main 等,1972;Rynd 和Gibian, 1970; Brown 和 Hamilton, 1970; Shinka 等,1974). 然而如像硫酚和硝基烷烃碳负离子那样的低活性底物, 对简单的黄素模型是稳定的.

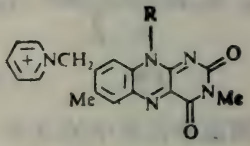
为了"激活"黄素分子作为氧化催化剂, 现在认识到有两个主要方法:(i)将黄素的氧化还原电位沿正值方向增大,(ii)借助第二辅因子或环境效应,将底物转化为更加"特异性"的底物. (*3.63*)—(*3.65*)式可作为实例说明方法(i) (Yokoe 和 Bruice, 1975; Bruice 等, 1977; Knappe, 1979; Sinkai 等, 1979f), 其中吸电子



(3.63)



(3.64)

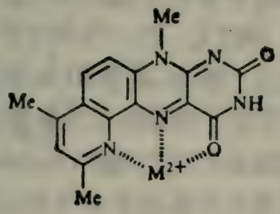


(3.65)

取代基使异咯嗪环缺电子程度增加, 例如(*3.63*)能在环境条件下氧化硫酚和 2-硝基丙烷碳负离子 (Yokoe 和 Bruice, 1975).

黄素辅酶对电子进出铁-硫蛋白,钼(黄嘌呤氧化酶)和血红蛋白起到载体的作用. 黄素与金属离子间的互相作用受到人们极大关注,但对金属-黄素互相作用的模型研究得非常有限. 原因很简单: 黄素对于除 Ag(I),Cu(I),Mo(V),Ru(II) 和 Fe(II) 等少数金属之外的其他金属离子、没有明显的亲和性(Fritchie, 1972; Bamberg 和 Hemmerich, 1961; Clarke 等, 1979; Selbin 等,

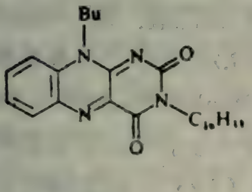
1974)，这些金属-黄素络合物的稳定性可能是由于金属向黄素的电荷转移. 为克服这一缺陷，Shinkai 等 (1982a，1983)合成了能与金属配位的黄素(*3.66*)，它结合了黄素骨架与熟知的螯合体 1，10-二氮杂菲，能络合各种金属离子. 由于金属离子的强吸电子



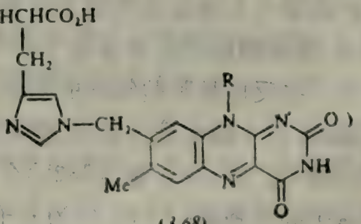
(*3.66*)

性，金属-(*3.66*)络合物成为强氧化剂，尤其 Zr^{4+}络合物，能在室温下氧化醇类. 这可以作为用方法(i)活化黄素的一个例子.

方法 (ii) "活化" 底物，与在脱辅酶蛋白-辅酶-底物三元复合物中脱辅酶蛋白的作用相同. 最便利而有效的方法是利用胶束和聚合物的疏水环境，在其中阴离子明显地被活化(Kunitake 和 Shinkai，1980). 与溶液中传统的黄素缺乏氧化硫酚和硝基烷烃碳负离子的能力相反，疏水性(*3.67*)和(*3.68*)结合到阳离子胶束中能在温和的条件下氧化这些底物 (Shinkai 等，1980b). 或许是胶束活化并浓集了底物，使氧化反应在胶束中易于进行，这暗示了胶束微环境的重要作用. 与之类似，固定在阳离子聚合物中的黄素起到硫酚和硝基乙烷碳负离子的氧化催化剂的作用，又由于阳离



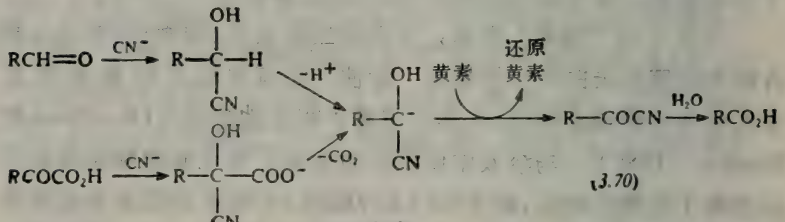
(*3.67*)



(*3.68*)

子聚合物和阴离子 NADH 间的静电作用，NADH 的氧化反应按 Michaelis-Menten 饱和动力学进行 (Shinkai 等，1978c，d，e；Spetnagel 和 Klotz，1978)。

基于 D-氨基酸氧化酶对 *β*-氯代丙氨酸的氧化反应 (Walsh 等，1971)，有人提出某些黄素酶不直接氧化底物，而是氧化它产生的共轭碱 (Kosman，1977)。这一观点对于在非酶体系中模拟黄素的氧化反应非常有益。例如，醛类和 *α*-酮酸都不能被黄素氧化，但是在氰离子存在下这些底物转化为氰醇碳负离子(*3.69*)，进行快速的黄素氧化反应给出相应的羧酸(Shinkai 等，1980c) (图 3.9)。噻唑(鎓)离子表现出与氰离子非常相似的催化活性，由醛与 *α*-酮酸形成"活化醛"中间体 (*3.71*)，(*3.71*) 迅速被黄素氧化 (Shinkai 等，1980d，e；Yano 等，1980) (图 3.10)。有趣的是这个反应模型令人满意地模拟了丙酮酸氧化酶的催化作用，该酶在 FAD 和焦磷酸硫胺素存在下将丙酮酸转化为乙酸。从 *α*-酮酸起始的一些反应是脱羧氧化的实例。由于(*3.70*)和(*3.72*)含有活性酰基，反应在醇中进行时得到相应的酯 (Shinkai 等，1980e；Yano 等，1980)。Shinkai 等(1982b)合成了在同一分子内含有黄素和噻唑离子的双辅酶(*3.73*)，作为分子内过程，(*3.73*)有效地催化了这一反应序列。



(*3.69*)　(*3.70*)

图 3.9

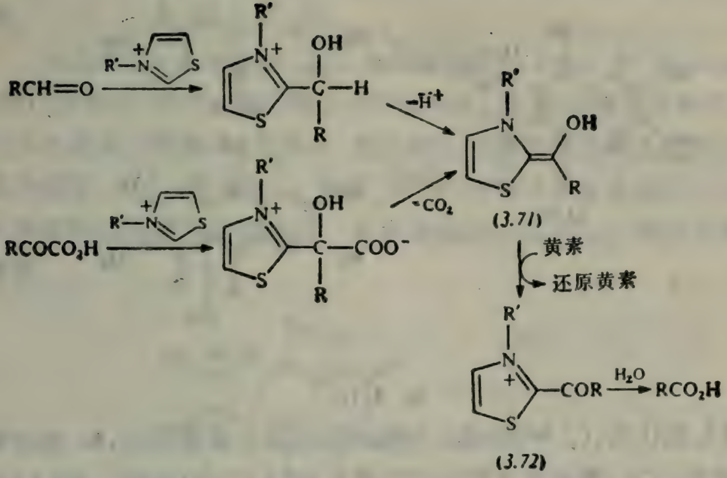
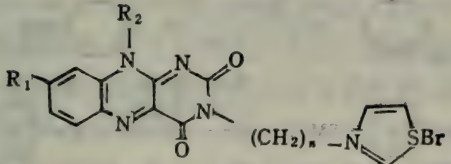


图 3.10



R_1=H, OH　R_2=CH_3, C_2H_5

(3.73)

3.3.2 作为加氧酶模型的黄素-氧复合体

还原型黄素(*3.56*)迅速被分子氧再氧化，产生过氧化氢，但在无氧条件下却能还原丙酮酸酯、硝基苯和醌类（Williams 和 Bruice, 1976; Gibian 和 Baumstark, 1971; Gibian 和 Rynd, 1969)。另一方面，(*3.74*) 中黄素骨架的N－5位被一个甲基封堵，则由单电子氧化产生自由基(3.75)，或加 O_2 生成 4a-氢过氧化黄素(*3.76*)（Kemal 和 Bruice, 1976a; Kemal 等, 1977)(图

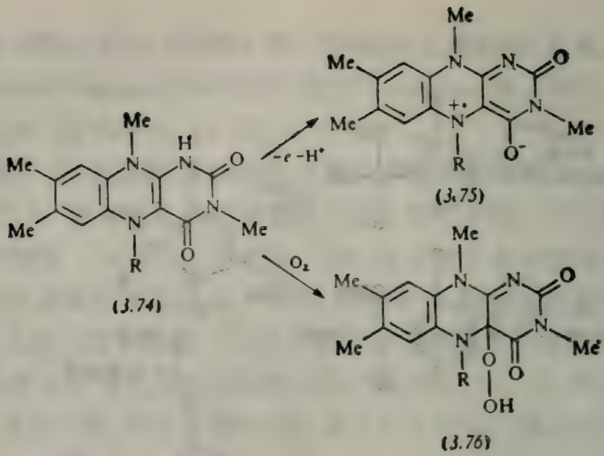


图 3.11

3.11).据认为,(*3.76*)的结构与酶的氢过氧化黄素类似,4a-氢过氧化黄素(*3.76*)将氧或双氧转移给硫化物(*3.77*)与(*3.78*)、胺(*3.79*)酚盐离子(*3.80*),吲哚(*3.81*)等 (Kemal 等,1977; Miller, 1982,

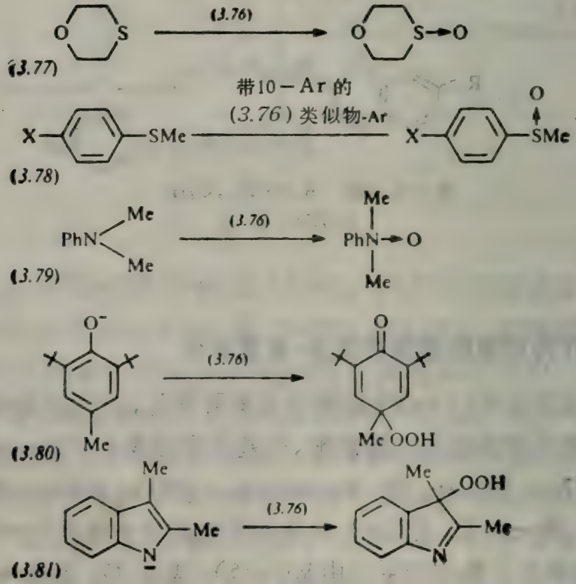
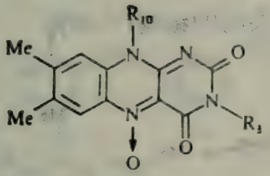
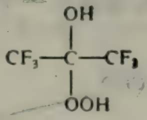


图 3.12

Ball 和 Bruice, 1980; Kemal 和 Bruice, 1979; Muto 和Bruice, 1980)(图 3.12). 因此,这些反应成为单、双加氧酶的典型仿生实例.

在此期间, Rastetter 及其合作者(1979; Frost 和 Rastetter, 1981)证明了 N(5)-氧化物(*3.82*)也向酚、胺、羟胺等传递单氧.他们认为在单加氧酶中,可能4a-氢过氧化黄素在传递氧之前即被转化为黄素 N(5)-氧化物. 黄素 N(5)-氮氧自由基是酶催化反应中最终羟化剂可行的候选物. 黄素传递的加氧反应机理尚不完全清楚.


(*3.82*)


(*3.83*)

Heggs 与 Ganem (1979)提出了更简化、在合成上更重要的加氧酶模型. 如前所述,氧化黄素具有类似三酮的结构. 换言之,(3.76)中的 4a-氢过氧化物两侧有两个吸电子基团,并与一个弱碱性的、电负性基团(5-NH)毗邻. 同时指出,极易从水合六氟丙酮与过氧化氢制得的(*3.83*),完全能满足这些条件,可以作为廉价的催化环氧化试剂.

3.3.3 细菌荧光素酶的模型研究

黄素化学的另一个吸引人的方面是模拟细菌荧光素酶生物发光的化学发光现象. 研究表明, 细菌荧光素酶催化生物发光的关键步骤是键合在荧光素酶上的 4a-氢过氧化黄素单核苷酸 (*3.84*) 与长链醛的反应 (Hastings 等,1973)(图 3.13).

Kemal 和 Bruice (1976b) 发现(*3.76*)在醛存在下发生的化学发光反应, 人的眼睛适应黑暗后可以看见. 当黄素的盐(*3.85*)与烷基氢过氧化物混合时,能观察到类似的发光现象,量子产率是

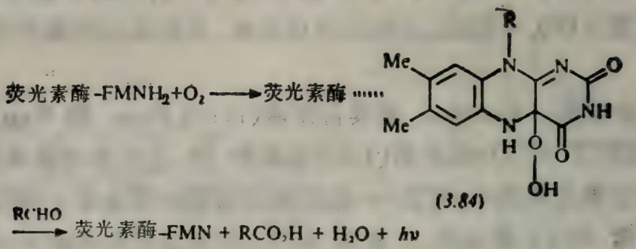


图 3.13

3.0—3.3 × 10^{-4} (Kemal 和 Bruice, 1977)(图 3.14). 他们提出了一些化学发光物种的一个共同的结构(*3.86*).

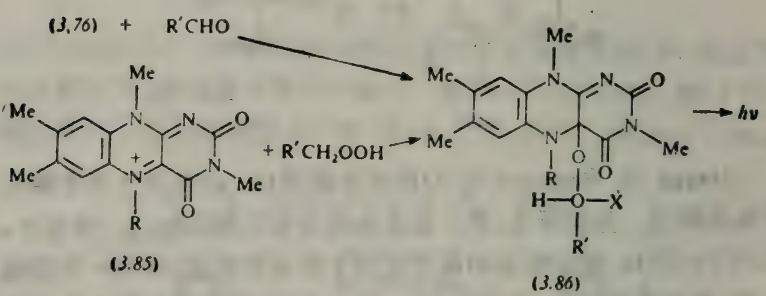


图 3.14

McCapra 和 Lesson (1976) 发现(*3.87*)和过氧化物(*3.88*)反应也有化学发光现象，量子产率是 5 × 10^{-6}—2.1×10^{-5}(图 3.15). 认为在这种情况下过氧化物的加成反应发生在 10a 位.

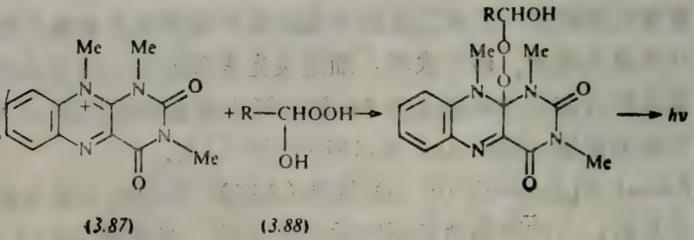
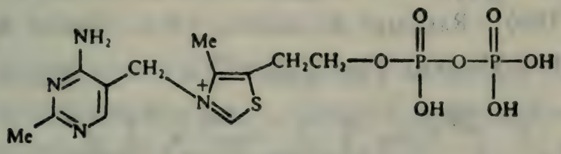


图 3.15

上述结果连同氧传递反应的一些结果提示人们，为模拟黄素蛋白的功能，用烷基取代不稳定的 $N(5)$-氢是必要的。可以想象，黄素辅酶的 $N(5)$-氢是借助氢键牢固地固定在酶的活性部位上的。

3.4 与维生素 B_1 及其类似物有关的催化反应

硫胺素焦磷酸(TPP)及其类似物(*3.89*)(维生素 B_1 族）可作



TPP

为缩合、脱羧和还原反应的催化剂。Breslow 在 1958 年曾指出，TPP 的催化作用可归因于噻唑(鎓)离子 (*3.90*) 的 2-H 去质子共轭碱，它与苯偶姻缩合反应中氰离子的作用类似。于是可以认为在噻唑离子催化的序列反应中，活性醛(*3.91*) 经常扮演一个关键的中间体的角色(图 3.16)。

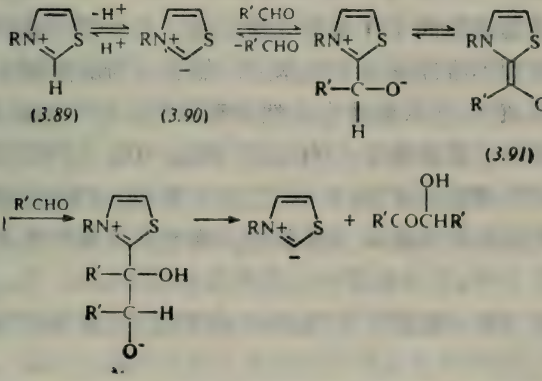


图 3.16

3.4.1 噻唑离子作为缩合催化剂

Breslow (1958) 曾证明，如果 2 位没有烷基封堵，在醇溶剂中和有碱存在下，各种噻唑离子具有对偶姻缩合的催化活性，缩合反应的潜力来源于活性醛(*3.91*)的强亲核性。Cookson 和 Lane (1976) 利用 (*3.89*: R=苯基) 由二醛合成环状 2-羟基-2-烯酮(*3.92*)；这是分子内偶姻缩合的一例. 化合物(*3.91*)不仅能进攻醛基，也进攻亚硝基苯(*3.93*)、二硫化物(*3.94*)、丙烯酸乙酯，丙烯腈 (*3.95*: X=COOEt, CN) 和乙烯基烷基酮 (*3.96*) (Corbett 和 Chipko, 1980; Rastetter 和 Adams, 1981; Stetter 等, 1980; Stetter 和 Kuhlmann, 1976)(图 3.17).

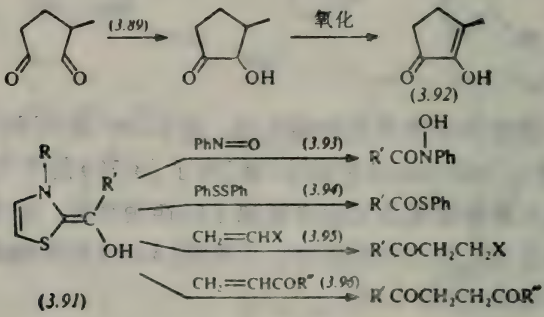
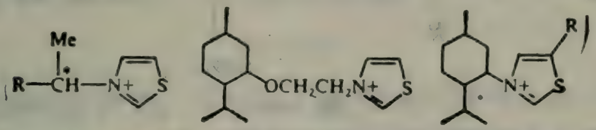


图 3.17

为了应用噻唑离子作为合成催化剂，Castells 等(1978)将噻唑离子固定到不溶性高分子载体上。然而，与醇溶剂中噻唑离子的活性相反，它们在水溶液中全然没有活性. 这可能是由于，OH^-催化噻唑环的分解优先于 2-H 去质子化. Tagaki 和 Hara(1973)发现表面活性噻唑离子如 *N*-十二烷基噻唑(鎓)溴化物在水溶液偶姻缩合反应中非常活泼. 类似地，噻唑离子共价键合到阳离子聚合物分子上时，在水溶液中也是活泼的 (Shinkai 等,1982c). 他们认为阳离子环境促进了 2-氢的去质子作用，从而增加了催化活性.

不对称合成是模拟噻唑离子催化作用的另一个有趣的研究内

容．由于噻唑催化的缩合反应产物乙偶姻和苯偶姻含有一个手性碳，预计缩合反应可以按立体选择方式进行． Sheehan 和 Hara (1974)曾报道有带手性 *N*-取代基的噻唑离子（*3.97*）在甲醇中给出光学活性苯偶姻．尤其是在（3.97：R=p—O_2N—Ph）存在时，



(*3.97*) (*3.98*) (*3.99*)

光学产率明显提高(51.5％)．Tagaki 等(1980)还考察了在胶束条件下不对称苯偶姻的缩合反应． 发现就苯偶姻的化学产率来说，(*3.98*) 催化活性高而(*3.99*)低，但(*3.99*)(35.5％)比(*3.98*)(1.8—3.5％)有较高的光学产率．此结果提示，*N*-取代基的手性中心应当是庞大的，而且靠近反应中心．

3.4.2 噻唑离子作为脱羧反应催化剂

另一个重要的 TPP-介导的反应是丙酮酸脱羧酶催化的、由丙酮酸生成乙醛的脱羧反应（Crosby 等，1970)；Kluger 和 Pike，1979；Kluger 等，1981；见第二章)．前面曾提到，在偶姻缩合反应中，硫胺素的催化作用很类似于氰离子在苯偶姻缩合反应中的催化作用，脱羧反应也有类似情况．对硫胺素催化脱羧反应所提出的机制，也包括关键中间体(*3.91*)． 可以写一个相当于氰离子催化的反应序列． 其中氰离子催化包含氰醇阴离子（*3.69*）作为关键中间体类似物（图 3.18)． 实际上在许多年前， Franzen 和 Fikentscher（1958）就已发现氰离子是 α-酮酸脱羧反应的优良催化剂．

这里应当注意到，脱羧反应的一个重要特征，就是对溶剂效应非常敏感．通常在偶极非质子溶剂中反应进行得很快，而在质子溶剂中由于羧基阴离子通过氢键的溶剂化作用，反应明显地受到

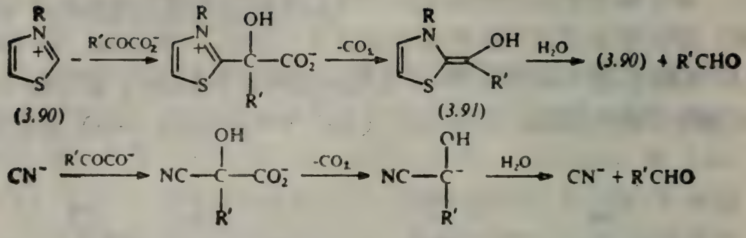
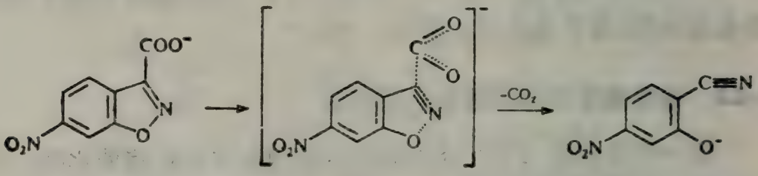


图 3.18

抑制（Kunitake 和 Shinkai，1980）（图 3.19）。例如，(*3.100*)在二甲基甲酰胺中的脱羧反应速度常数比在水和甲醇中分别快 5.1×10^6 和 1.5×10^5 倍（Kemp 和 Paul，1970）。如果溶剂效应能再现某一部分酶催化作用，则此结果说明在酶的不含水而又疏水的活性部位上，酶的脱羧反应将被显著地促进，如在第二章中所讨论过的那样。



(*3.100*)

图 3.19

正如所预期的那样，噻唑离子介导的 α-酮酸脱羧反应在水溶液中不发生或很难发生（Crosby 等，1970；Shinkai 等，1980e）。然而阳离子胶束结合噻唑离子（*3.89*：R=n-$C_{16}H_{33}$）则可以在环境条件下催化 α-酮酸的脱羧反应。此结果表明，胶束的疏水微环境有利于脱羧反应，而且与(*3.100*)的脱羧反应在阳离子胶束中加速 90 倍，这一事实相一致（Bunton 等，1973）。然而，对噻唑离子介导脱羧反应中的溶剂效应尚未充分了解。

3.4.3 噻唑离子作为还原剂

关键中间体(*3.91*)通常表现出很强的亲核性，因而成为单电

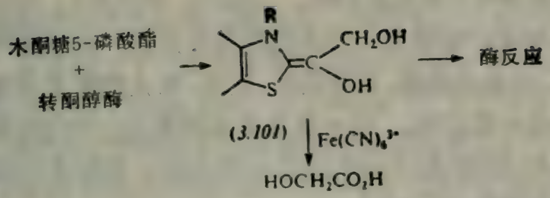
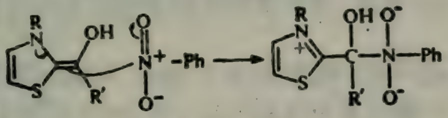


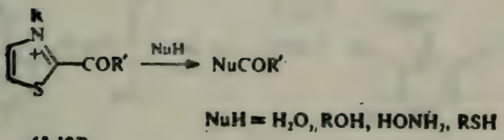
图 3.20

子受体底物的还原剂. Christen 和 Gasser (1980) 和 Cogoli-Greuter 等(1979)曾证明,丙酮酸脱羧酶和转酮醇酶由于六氰合铁(III)酸离子或 H_2O_2 而发生了不可逆的失活作用. 这些依赖TPP的酶在其反应序列中包括 TPP 类似物(*3.91*),而后者能被单电子氧化剂氧化捕获. 例如转酮醇酶产生的二羟乙基中间体 (*3.101*) 迅速被六氰合铁(III)酸离子氧化成羟基乙酸(图 3.20). 此结果清楚地表明,关键中间体(*3.91*)不仅可以作为亲核试剂,也可以作为还原剂.



(*3.102*)

图 3.21



(*3.103*)

图 3.22

如在黄素催化作用一节中所提到的,(*3.91*)类似物迅速还原黄素 (Shinkai 等,1980d,e,1982b; Yano 等, 1980). Inoue 和 Higashiura (1980) 发现,(*3.91*:R=苯甲基)在甲醇中加碱,分别将吖啶和 10-甲基吖啶氯化物还原为 9, 9′-双(9, 10-二氢化吖啶)和10,10′-二甲基-9,9′-双(9,10-二氢化吖啶). 这些事例表明

(*3.91*)具有单电子给体的特性. Castells 等(1977) 用对硝基苯甲醛作为底物进行噻唑离子传递的醛缩合反应，出乎意外地未检测出 4,4′-二硝基苯偶姻,只有硝基-偶氮-氧化偶氮苯甲酸和酯这样一些自氧化还原产物. 这一发现提示硝基是(*3.91*)的氧化剂. 他们假定(*3.91*)对硝基(*3.102*)进行亲核进攻，但还不能排除电子转移机理的可能性(图 3.21).

Daigo 与 Reed (1962) 以及 White 与 Ingraham (1962)证实2-酰基噻唑离子(*3.103*)易被亲核试剂断裂：例如,(*3.103*)与水作用得到羧酸,与醇作用得到酯、与羟胺作用得到异羟肟酸、与硫醇作用得到硫酯. 也就是说，(*3.103*) 是一个万能的酰化剂(图 3.22). 由于(*3.103*)可以由噻唑盐和醛一步生成,因此可以容易地由醛转化为酯等 (Shinkai 等, 1980e; Yano 等,1980; Inoue 和 Higashiura, 1980).

3.5 吡哆醛的催化作用

众所周知,吡哆醛(维生素 B_6) 经由 Schiff 碱及其互变异构式(*3.106*)能进行催化反应 (Metzler 等,1954)(图 3.23). 依赖吡

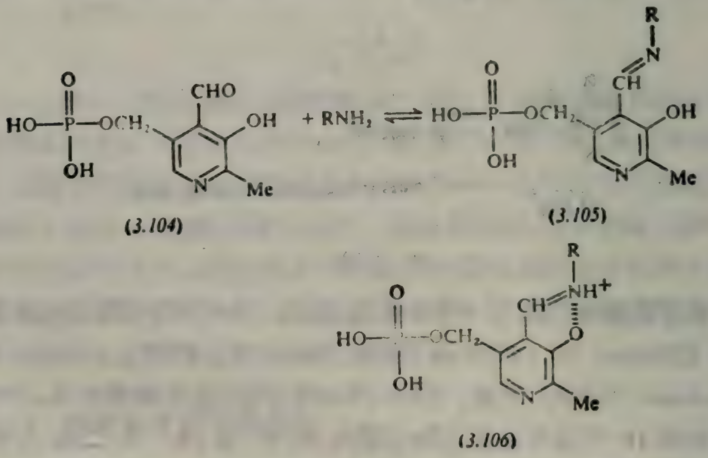
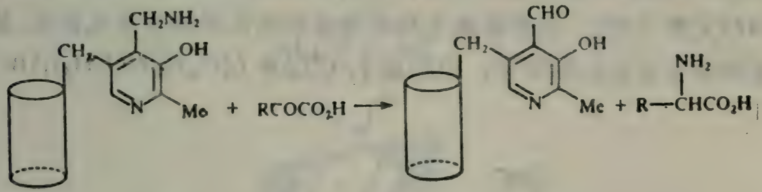


图 3.23

哆醛的一些酶能催化多种氨基酸反应，如脱羧反应、消除反应、转氨反应等. 尽管研究了这些反应机理方面的问题，然而对有机化学的影响相当有限. 例如 Llor 和 Cortijo (1977) 指出,(*3.105*)与(*3.106*)之间的互变异构可以用来测定溶剂的极性，这两个互变异构式最大吸收不同(分别是 415,335nm)，它们的相对强度随溶剂极性的大小而改变. 他们证明平衡的 ΔG 与 Kosower 的 Z 值有线性关系. 这个模型成为测定吡哆醛-辅佐酶活性部位极性的特别有用的办法.

Buckley 和 Rapoport (1982) 曾说明模拟吡哆醛的一个有趣的在合成上的应用: 在碱存在下 4-甲酰-1-甲基吡啶鎓离子可作为将伯胺转变成醛和酮的化学修饰试剂，收率相当好 (77—94%). 这个过程不仅从仿生化学观点来看是有意义的,而且作为这种转化过程的简单替代方法也是重要的.

Breslow 等(1980)将吡哆胺单元连结到 β-环糊精上,考察转氨基反应和诱导手性进程中的底物特异性.虽然吡哆胺对三个 α-



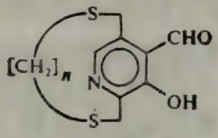
(*3.107*) (*3.108*)

图 3.24

酮酸(*3.108*: R═Me,苯甲基,CH_2—吲哚)表现出相似的反应活性,但(*3.107*)催化吲哚丙酮酸 (*3.108*: R═CH_2—吲哚)的转氨反应效率比没有环糊精时要高出 200 倍(图 3.24).对丙酮酸(*3.108*: R═Me)没有观察到邻近环糊精引起的加速作用. 显然，差别是由于吲哚基被结合进 β-环糊精的空腔中. 因为 β-环糊精的空腔是手性的,有可能在产生的 α-氨基酸中诱导出手性. Breslow 研究组报道,二硝基苯基色氨酸和二硝基苯基丙氨酸分别有过量 12% 和

52%的 L-异构体，因此这个“人工吡哆醛酶”表现出明显的光学诱导作用。

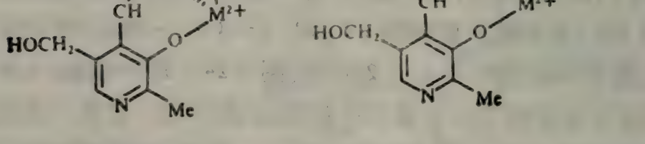
Kuzuhara 等(1978) 合成了包含在不对称的环璠结构中的吡哆醛类似物(*3.109*)，发现大小等于或小于 14 元环的璠衍生物 (即 (*3.109*)：$n=4,5,6$) 可以光学拆分为其对映体 (Iwata，等 1976)。又在铜离子存在下用 [*3.109*：$n=5$，(−)式] 进行 L-与 D-谷



(*3.109*)

氨酸的外消旋化，测定在类吡哆醛的催化作用中的立体特异性 (Kuzuhara等，1977)，但发现 L-异构体仅比 D-异构体快 1.3 倍。

通过从 Schiff 碱(3.110)除去 *S*-苯基半胱氨酸的 α,β-消除反应，考察了胶束对吡哆醛催化作用的影响(Murakami和 Kondo，1975)(图 3.25)。尽管阴离子和非离子胶束几乎没有催化效应，甚至稍微表现出抑制作用，但阳离子 CTAB ([$C_{16}H_{33}N(CH_3)_3$]Br)

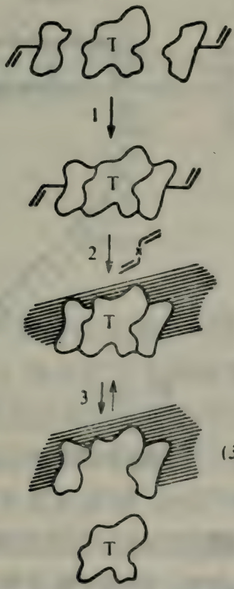


(*3.110*)

图 3.25

胶束却使消除反应加快 7.1 倍. CTAB 胶束的催化效率大概起因于 OH^-浓度的增加，OH^-夺取 α-氢而诱导 α,β-消除反应. Nakano 等(1981)也发现吡哆醛促进的丝氨酸 α,β-消除反应，因金属离子和季铵化聚 (4-乙烯基吡啶)的存在而更易进行. 聚合物与 Schiff 碱-金属络合物之间静电力的贡献被用来解释有助于反应速度的加速. 这种消除反应曾用来作为设计酶抑制剂的基础（第五章).

酶促体系设计中一个新近值得注意的发展是，以立体化学控制的方式选择性地引入有机官能团，并且经历合成始终保持这些官能团立体化学原样(也见第四章). 利用经过不溶化过程的大分子模板合成，可以使‘空胞’(ghost) 大分子 (*3.111*) 对原始模板(‘T’)有特殊的‘记忆’ (Shea 等,1980; Shinkai,1982)(图3.26).



(*3.111*)

图 3.26

这些研究工作仍在进行中 (Nishide 等,1976; Wulff 等, 1977; Shea 等, 1980; Damen 和 Neckers, 1980). 这一图式使我们联

想到辅酶对脱辅酶蛋白或底物对酶的特异结合. Belokon 和他的同事(1980)把这个概念用于吡哆醛体系. 通过(*3.112*)与丙烯酰胺和(*3.113*)共聚，随后用 EDTA 除去铜离子，制备了一种聚合物凝胶(*3.114*)，在 pH > 6.0 时，其中水杨醛和赖氨酸部分能生成内部的醛亚胺(图 3.27). 发现此“内部”醛亚胺的平衡生成常数比模

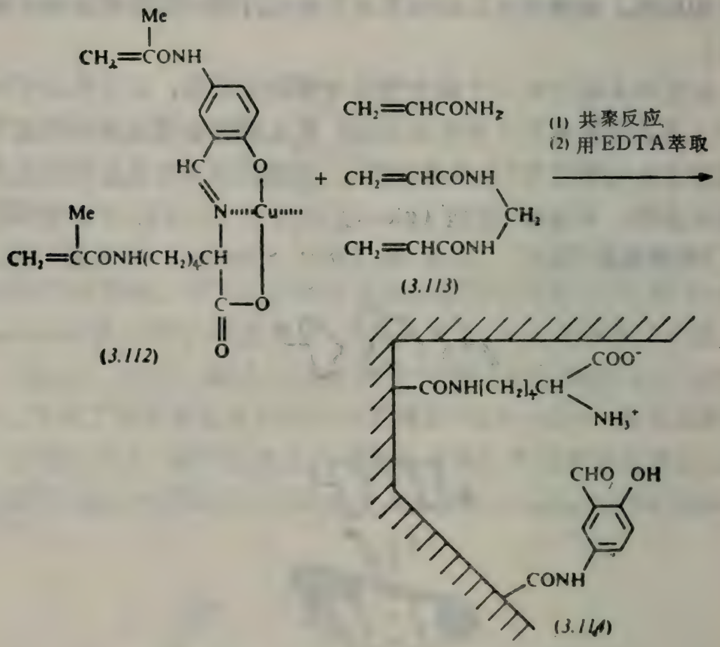


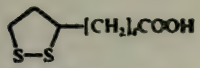
图 3.27

型反应高约 30 倍(pH = 7.1)和约 100 倍(pH = 9.2). 这一实验结果提示，生成醛亚胺的“记忆”被保留在不溶化的聚合物中.

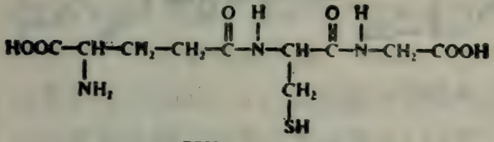
另一个重要的吡哆醛传递的反应是脱羧作用，如前所述，这一反应高度地依赖于反应介质. 因此，为了模拟脱羧酶的催化作用，必须考虑到羧基的溶剂化. 曾报道吡哆醛传递的氨基酸的脱羧反应需要在相当激烈的条件(100℃ 4h)下才能发生(Kalyankar 和 Snell, 1962)，但尚无环境条件下模型反应的实例.

3.6 硫醇辅酶的催化作用

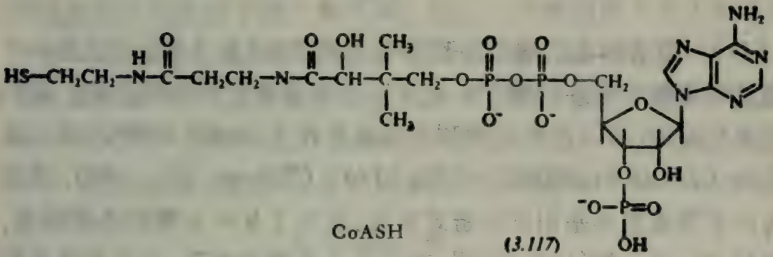
生物体系中常见的巯基辅酶是硫辛酸 (*3.115*)，谷胱甘肽(GSH:*3.116*)和辅酶 A(CoASH:*3.117*)。尽管这些辅酶催化的反



硫辛酸 (*3.115*)



GSH (*3.116*)



CoASH (*3.117*)

应范围很广，从有机化学的观点看仍可将其催化作用归入以下类别：巯基辅酶作为 (i) 强亲核试剂同时是一个很好的离去基团，(ii)包括基团转移的氧化还原反应的介导体，(iii)促进 Elcb-型去质子作用的吸电子基团。本文不涉及 (i) 类内容(见 Kunitake 和 Shinkai, 1980)。

硫辛酸广泛分布于微生物中，且常与 TPP 偶联：即是从(*3.91*)接受一个酰基，然后将它转移给 CoASH(图 3.28)。Rastetter 和 Adams (1981) 曾报道一个模型反应的例子 (见 4.1 节)。Takagi 等(1976) 利用二氢硫辛酸和硫辛酸之间的氧化还原对偶来活化酰基。(*3.118*)在甲醇中被 I_2 氧化，给出活性酰化中间体

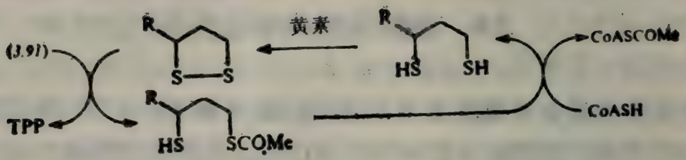
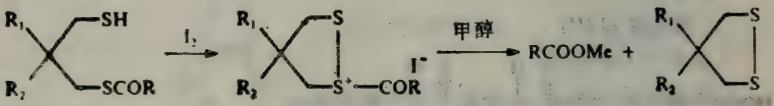


图 3.28



(3.118) (3.119)

图 3.29

(*3.119*),后者容易对溶剂甲醇发生亲核进攻(图 3.29)．这是一个通过氧化转移酰基的例子，也是一个简易的合成酯的方法．他们后来又发现,可以在光化学和自由基条件下,由醛(RCHO)与二硫化物 ($R_1R_2CCH_2SSCH_2$) 得到(*3.118*) (Takagi 等，1980),并提出由于光或自由基引发的链式反应,发生了 S — S 键的还原断裂．同时 Nambu 等(1981)证明,在三正丁基膦存在下,由硫辛酰胺和一羧酸生成了(*3.118*)的类似物． 他们还将硫辛酸固载到交联聚苯乙烯小球上 (Nambu 等,1980)．

另一个有趣的性质是结合在硫酯 α-碳上的氢,容易以质子形式脱去(辅酶-$SCOCH_2R \xrightarrow{-H^+}$辅酶-$SC\bar{O}CHR$：Yaggi 和 Douglas,1977)．对于后面的缩合反应来说,这是一步预平衡反应．Wilson 和 Hess (1980)曾探索硫酶烯醇阴离子在合成方面的应用．如硫酯与碱通过碳负离子中间体反应，可由链延长得(*3.120*)和环化为(*3.121*)(图 3.30)．

Oae 等(1961) 提出硫原子能稳定邻近的碳负离子．这一事实对于阐明乙二醛酶 I 的反应机理是一个重要线索．乙二醛酶 I

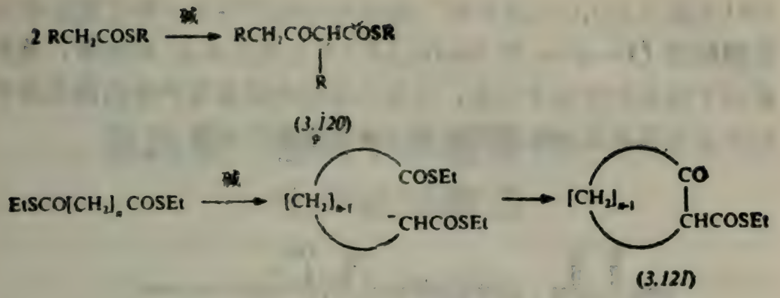


图 3.30

（依赖 GSH 的酶）催化乙二醛转化为相应的 α-羟酸酯的反应机理曾是一个有争议的问题。Racker（1951）和 Franzen(1955)提出类似于 Cannizzaro 反应的分子内 1,2-氢负离子转移(*3.122*)，但并未排除烯二醇机理的可能性(*3.123*)(图 3.31)。近来，几个互相独立的实验支持了烯二醇机理：(i) 一个溶剂质子并入到了生成物 α-羟酸酯中（Hall 等，1978），(ii) 烯二醇中间体(*3.123*)迅速被黄素捕获，而黄素对于包含 1,2-氢负离子转移机理的中间体(*3.112*)来说并不是有效的氧化剂（Shinkai 等，1981b)(图 3.31)，(iii) 氟甲基乙二醛通过 β-消除转化为丙酮酸，（Kozarich 等，

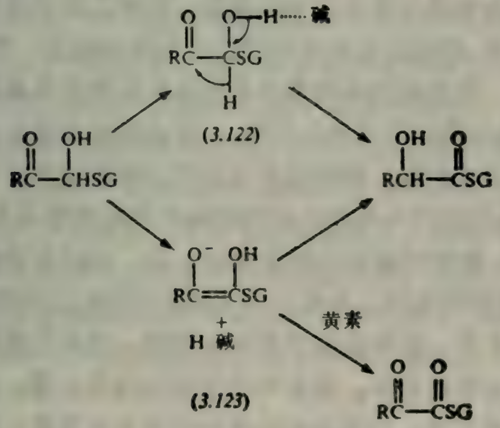


图 3.31

1981)(图 3.32),(iv)具有烯二醛结构的物质作为一种过渡态模拟物抑制剂（Douglas 和 Nadvi,1979)(见第五章). 结论是，首先是由于酰基的吸电子性质，再加上邻近硫醚基对产生的碳负离子的稳定化作用使半硫醇缩醛有作为碳素酸的酸度.

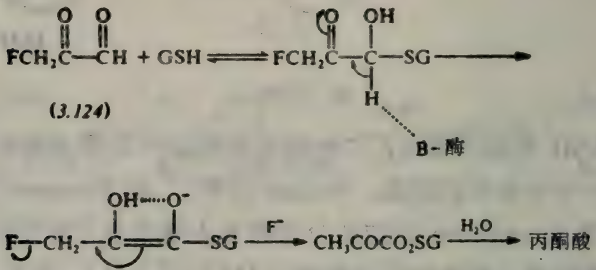


图 3.32

3.7 结 束 语

本章引用的文献一致表明辅酶的反应活性受溶剂效应、金属离子、胶束、聚合物及主体分子等的控制. 控制立体选择性看来比控制反应活性难，但也已经在某些模型体系中实现了. 然而，人们也许注意到了，要同时提高模型体系的反应性和立体选择性仍然是困难的，而这正是酶所具有的特色. 对此问题应当付出更多努力. 同时值得注意的是，辅酶化学在合成方面的应用正在迅速增长. 显然，迄今的成功与巧妙设计的辅酶骨架有密切关系，它们像 Jencks（1969）曾称呼磷酸吡哆醛那样，是“上帝”创造的最好催化剂. 最后，因篇幅所限，未能讨论生物素、叶酸、抗坏血酸、维生素 B_{12}、维生素 K 等. 抗坏血酸常用作还原剂，对其它辅酶和维生素的模型研究还相当有限. 用有机化学家的眼光来看，这些辅酶和维生素的化学功能，作为仿生化学的目标是非常诱人的. 预期发源于辅酶的优异催化剂将继续进一步发展.

第四章　合成中的选择性——化学法或酶法

Colin J. Suckling

(Department of Pure and Applied Chemistry, University of Strathclyde, Glasgow, UK)

4.1 引　　言

当今有机合成发展的一个特点是着重选择性．在化学反应中，选择性有许多形式．在最简单的层次，化学家关心尽可能保证只发生所要求的反应(化学选择性)，在这方面首先达到高发展状态的领域之一是多肽合成．多肽的选择性合成之所以成为可能，是由于想出了保护或封阻基团，使得能够顺次构成所要求的多肽．现在有经验的多肽化学家能作出的保护基团接近最佳选择．保护基团化学的进一步发展已导致低聚核苷酸特异合成的有效程序．

在第二个控制层次，化学家希望确定在两个或更多类似反应性的位置中，在哪个位置发生反应(位置选择性)．已经有一些成功的控制位置选择的化学方法．例如，通常发现反应物活性越小则它的作用选择性越大；此外，选择反应条件使动力学上或热力学上受惠的产物占优势，有时也能控制反应．前者例如在烷烃卤化中溴原子比活性较大的氯有较大的选择性，而按反应条件则位置选择性地生成酮烯醇化物可以作为后者的例子．或许有机化学家所要求的最巧妙的控制是立体化学控制，特别是只生成所要求的一种旋光异构体(立体选择性)．近年来立体化学控制在多数合成研究中占了第一位．如我们将要看到的，酶化学能直接或间接地对合成中的控制作出巨大贡献．为了讨论方便，我将把酶和微生

物在合成中的应用称为生化方法，把不包含这两者的传统反应称为化学方法.

现代化学家专心致力于选择性有几个原因. 一方面有尽可能完全地控制合成反应位置选择性和立体选择性的学术目的；这企图不仅由于在合成中力求完美，也由于一些实用上的原因；另一方面，许多天然存在的化合物，它们是常见的合成目标，只有一种立体异构形式有所要的生物活性；再一方面，工业中避免浪费的和可能有害的副产物的经济压力日益要求化学家给予更多的注意.

"选择性"这个词是近来许多文章的标题和 Norman 最近一篇文章(1982)的特色，后者确定了化学家控制选择性可采取的几种方法. 他考察了已确立的一些化学方法，如邻近基团效应和以上提到的控制反应活性的方法；但也在这样一个广泛的讨论中，第一次通过包括一些仿生的例子提出了酶的选择性. 不过，除开多核苷酸合成，化学家在利用酶上一直是迟缓的. 很可能没有普遍地认识到可以应用酶化学的合成反应数目很多. 或许时常难以看出酶的应用怎样帮助合成，或者在合成的哪个阶段酶化学可以有最大价值. 这一章将现今控制合成转变的某些选定化学试剂的能力与类似的酶催化反应的性质作比较，来考查控制途径. 放眼未来，也将讨论仿生体系在合成中的成就与潜力.

像我已说到的，直到约 10 年以前，还很少注意在一般有机合成中利用酶. 从 Fleming (1973)有名的教科书"Selected Organic Syntheses"(精选有机合成)中摘录以下几行可以说明当时流行的观点.

> "实际上，这…合成应用了一种微生物氧化，即使在原理上也不是一个全合成；应用这种本身不是被合成出来的微生物，因此这一途径没有资格作为通常被接受的学术意义上的全合成."

后面又说到

> "它们(酶)有难以估量的优点，即能够进行高度专属性的反应，无论是对多官能分子还是对完全无官能的分

子…. 它们不全是方便的实验室试剂，虽然有些酶，如像有相当可预见性质的核糖核酸酶就属于这种.

这些话提出了一种严格的学院观点，但也准确地突出了70年代早期的形势. 有趣的是，在该书中只有两个生化合成方法的例子出现，而且都是属于工业合成的. Fleming 的注释"从工业实践的观点，这简直就是实现此反应的最好途径"，对于有兴趣达到某一目标的任何现代化学家确实是一个明智的忠告.然而，甚至就在10年以前，应用酶和微生物的方法还没有吸引一般合成化学家的注意. 潜力虽然明显存在，但问题也如此（Suckling 和 Suckling，1974）. 其中主要是使用中酶的稳定性和最重要的辅酶的再循环问题. 从前一章可以明显看出，辅酶的本性实际上是结合在酶上的试剂. 在解决这些问题方面已有很大进步，特别是多伦多的 Jones 和麻省理工大学的Whitesides的实验室（Whitesides，1976），现在已能够在相同条件下对酶和传统做法进行比较. 不过，本章加以比较的是第三条路线，仿生化学. 正如酶在10年前那样，目前它既有希望也还存在问题.

区别基本上只有一种催化活性的精制酶与具有许多催化活性的微生物发酵是重要的. 虽然一个合成化学家需要对他所做的反应有预见性，然而微生物方法并不总是有吸引力的，尽管像我们将要看到的那样，它可能极为有效. 另一方面，许多酶催化反应现今是高度可预见的，并在合成有机化学家的保留节目中争得了它们的一席之地. 很可惜，多数有机合成的标准参考书中都省略了酶. Fieser 的试剂系列书中没有提到酶，但 Theilheimer 的著作却是有用的参考书. 有关资料最丰富的汇集在 Weissberg 有机化学技术丛书（Jones 等，1976）中. 鉴于这种情况，如果某个酶供应商促成出版一本在合成上应用酶的商品目录的书是会有效益的. 他们的销售口号可能是"控制选择性的一种易得到的有用的资料".

4.2 解决了的问题

为了利用酶选择性的优点，解决辅酶再循环和酶稳定性等实际问题是很有必要的． 说明过去10年内酶在合成应用中发展的一个很好的例子是氧化还原辅酶烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（NAD，辅酶I）或它的3′-磷酸酯（NADP，辅酶II）的再循环． 经常有人提出，羰基是合成中最重要的官能团，在还原醛和酮为醇，同时控制产物的手性方面有显著意义．传统的化学解决办法是在底物或试剂中应用庞大的基团阻碍其从羰基的两个对映面中的一面趋近．有一种酶具有控制进攻方向的结构，但是，这种氧化还原酶（脱氢酶）需要化学计量的辅酶 NAD 的还原形式 NADH 的帮助（图 4.2）． 这个辅酶比最昂贵的同它竞争的选择性化学还原剂还贵得多（每摩尔 £10,000）． 因此如果酶催化的羰基还原要在合

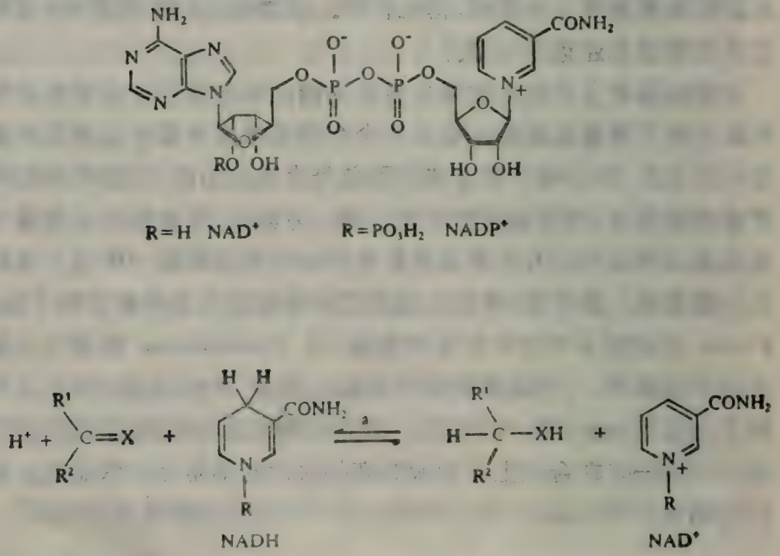


图 4.1 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸及脱氢酶催化的一些反应
a = 马肝-醇脱氢酶(HLADH)；R^1 = 烷基，R^2 = H，X = O；
a = 乳酸脱氢酶(LDH)，R^1 = CH_3，R^2 = CO_2H，X = O.

成中实际应用，辅酶的再循环是至关重要的。第一个广泛应用的方法使用了偶联底物(例如 Battersby 等,1975),而且它极好地说明了酶在合成中的另外一个分支——可逆催化（图 4.2)。在这个

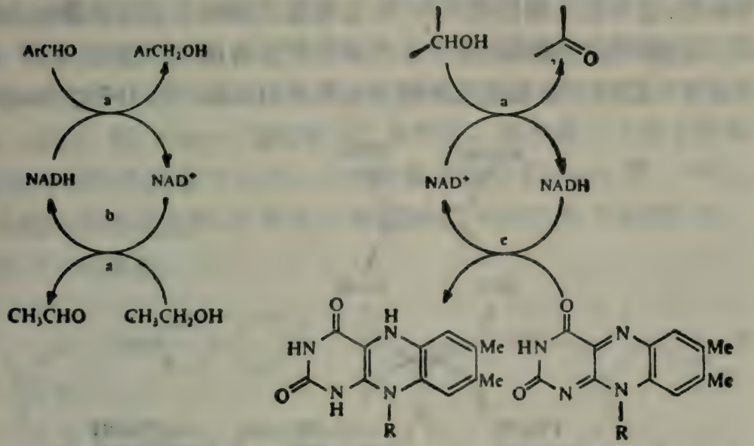


图 4.2 NAD⁺/NADH 的一些再循环方法

a.HLADH; b.$Na_2S_2O_4$; c. 应用黄素单核苷酸(FMN)的化学氧化.

醛的还原反应中使用了过量的乙醇：氧化形式的 NAD 同酶作用将辅底物乙醇氧化,由此再生成所需的还原剂 NADH。这个方法被广泛应用于合成一些手性标记的苄醇。此后不久，Jones 和 Beck（1976）以及 Jones 和 Taylor（1976）证明,也可以应用另外加入的化学氧化剂或还原剂来实现辅酶的再循环。如果需要 NAD(P)H 用于还原,连二亚硫酸钠适于用来使辅酶再生,如果需要的是氧化,则黄素单核苷酸(FMN)对 NAD(P)的再循环有效。

不过,这些方法都没有应用到大过几克底物的计量,直到 Whitesides 才有达到 1 mol 规模的 NAD(P)H 再循环方法的报道。Whitesides 工作的成功是以这样一个事实为基础的，即能够在同一反应瓶中应用几种酶的混合物，每一种有不同的催化活性，互相之间又不发生干扰。化学试剂几乎从来没有这样的相容性或配伍性。应用一个偶联酶，NAD(P)⁺ 可以被还原为 NAD(P)H，同时第二个酶的底物被氧化。经验已证明，为了替续

NAD(P)+的还原,最好的酶是葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD).因此葡萄糖-6-磷酸成为这种还原作用的终端还原剂或燃料(图 4.3).但是,由于葡萄糖-磷酸并不价廉,如果它也能用酶法再生,那将是有利的.这可以用能催化 ATP 对葡萄糖的磷酸化的己糖激酶来实现.现在酶链已把推动整个反应系列的任务接力传递给 ATP,幸而它又可以用化学法或酶法便宜地生产(Lewis 等,1979; Leuchs

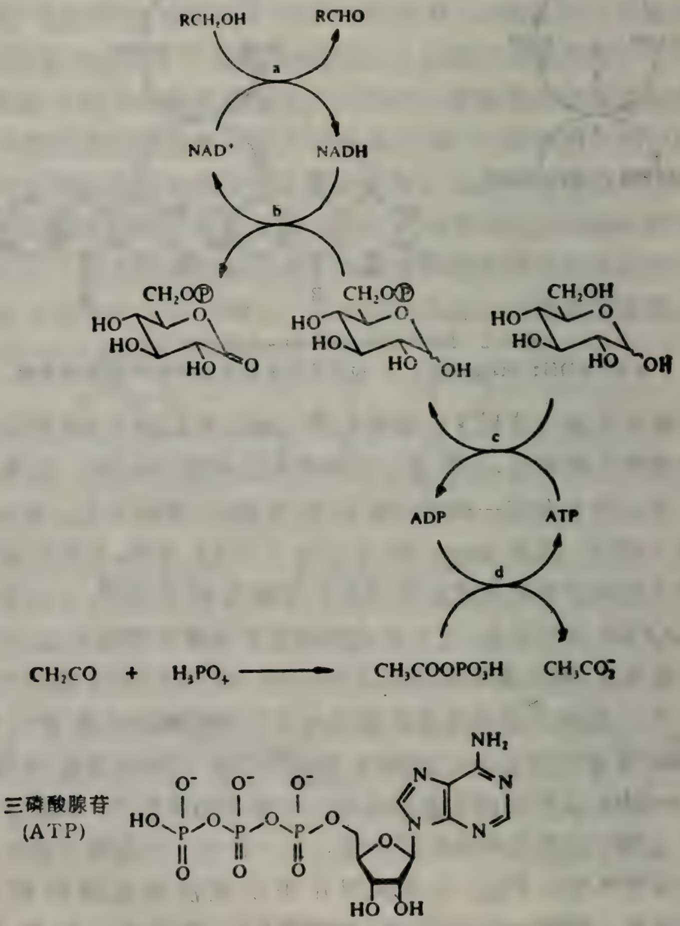


图 4.3 偶联在一起的 ATP 和 NAD+的再循环

a.HLADH; b.葡萄糖-6-磷酸脱氢酶; c.己糖激酶; d.乙酸激酶.

等,1979).

当这种偶联的酶催化反应链应用到多达几个摩尔反应物时还是有效的,但规模更大时,协作的酶和替续底物的数量和用量就大到妨碍其应用了. 这时电化学方法或用氢作终端还原剂比较合适. 在电化学方法中,也用了偶联体系,其中甲基紫精起电子载体作用,将电子从阴极传递给还原 $NAD(P)^+$的酶(图 4.4;Dicosimo 等,1981). 像 Simon 与同事所已表明的,这种做法不限于精制酶.微生物的还原也可以由电化学能量来推动(Simon 等,1981). 当终端还原剂是氢时,替续组分是能还原 NAD^+ 为 NADH 的一种酶——还原酶.

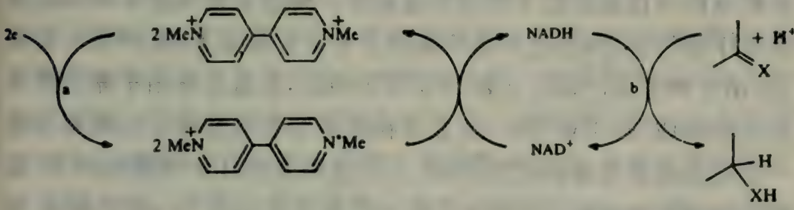


图 4.4 NADH 的电化学再循环

a.甲基紫精在阴极(W 或 Hg)还原; b.酶促还原,例如用 HLADH 或烯醇化物还原酶.

在讨论的这个阶段,首先对传统化学试剂与酶促合成步骤作一直接比较是合适的. 对这两种途径,氘化苯甲醛的还原在文献中已有特别好的记载. Midland 等(1979)叙述了用从蒎烯衍生的手性硼烷合成手性氘化苄醇. 它的研究组在实验室小规模达到S-异构体大于 90%的对映体超量. 类似的酶反应用马肝-醇脱氢酶催化,以 0.4mol 的规模进行(Wong 和 Whitesides, 1981),得到95%对映体超量的产物. 有意思的是,应用乳酸脱氢酶的同样技术已被用来制备同样旋光纯度的 D-乳酸. 从这些例子看,无可怀疑,化学和酶技术都是实际可用的. 按照 Fleming 的说法,纯化学家可能从全合成的观点漠视酶法. 但是,由于在化学法中手性的来源是蒎烯,它是从树木中由酶的不对称诱导得到的天然产物,两种方法的差别仅在于酶起作用的阶段不同. 因此,从哲学立场

来反对合成中应用酶，看来缺乏有力的根据. 在合成中应用酶不是朦骗，如果它起作用，就用它；如果不行，就尝试其它的做法.

在刚才记述的制备性还原中，Whitesides 广泛应用了固定化酶. 恰如固定化的化学试剂有后处理简便的优点，固定化酶便于从反应物和产物的溶液中迅速分离出昂贵的催化剂（Chibata，1978；Suckling，1977）这是可贵的. 但更重要的是，普遍地发现固定化能增加酶的稳定性，这样就可能解决酶用在合成中的第二个问题. 在许多可用于酶固定化的方法中，已经证明可广泛应用（Pollak 等，1977，1978）. 一种专门合成丙烯酰胺和N-羟基丁二酰亚胺丙烯酸酯的聚合物. 因固定化试剂的攻击而损害酶活性部位的危险可以通过以下方式尽量减小，即在底物或者一种抑制剂存在下进行固定化，这两者都能结合在活性部位上，保护它不受攻击. 用这种方法已固定化数目非常多的酶，数量足够用于摩尔规模的化学合成. 在工业应用上，能否得到有活性而又稳定的酶制剂是一个过程能否生存的差别所在. 关于这一点有几个明显的例子，包括应用固化真菌细胞的柱，专属性地催化甾醇的 11-β-羟基化和随后的 1，2-脱氢作用（Mosbach 和 Lasson，1970；Chibata，1978），生成皮质甾体. 这些反应与 Fleming（1973）已记述的这些内容有关. 值得注意的是，应用固定化催化剂的微生物转化首先进行一个非活化碳原子上的位置选择性和立体选择性羟基化，其次进行专属性的脱氢. 这些转化用传统的化学试剂是不可能的. 然而，从本章后面一些内容我们将看到怎样用仿生实验来处理这些问题.

酶稳定性的另一个方面是许多酶对氧的敏感性. 通常这种酶含有重要的硫醇基，它们容易被空气氧化成为无催化活性的二硫化物. 为了防止氧化性失活，酶催化反应可以在惰性气氛，最好是氩气中进行，或在外加的硫醇，如二硫（代）苏糖醇或巯基乙醇的存在下进行；这些硫醇被外来的氧所氧化，替代了酶的敏感官能团. Whitesides 的研究组也非常周密地研究了这个问题（Szajewski 和 Whitesides，1980），实验技术并不比操弄现代空气敏感试剂更难. 酶对有机溶液的耐受能力表明，酶在有机合成中普遍应用的

进一步扩展。例如，Jones 和 Schwartz (1982)最近指出，HLADH 能在高达 50% 的许多与水有互溶性的溶剂中专属性地起作用。

4.3 酶和微生物在合成上应用的逻辑和类比

每一个有机化学家都借助于结构和机理的类比来认识他的专业。如果生化方法容易被接受，化学家期望能够把酶催化反应归入同一体系，不是不合理的。按照 Sih 和Rosazza (1976) 以及 Perlman(1976) 的观点，即使微生物，也表现出对有机化合物的可认识的反应活性模式。他们指出，酵母容易转变羰基，真菌引起羟基化，而细菌一般太具破坏性。需氧的微生物用于有机合成特别简单，因为与纯化的酶不同，它们能再循环它们自己的辅酶；它们所需要的只是含有适当营养物的生长介质。主要的实际问题是产物的孤离，在规模增大时可能变得严重。不管微生物方法在简便方面多么有吸引力，除非能得到效果显著的实例，多数化学家都不会表现兴趣。可喜的是已报道一些近期工作 (Fronza 等，1980; tFuganti 和 Graselli, 1979, 1982) 应用酵母制备手性合成子 (synhons) 作为某些复杂天然产物合成的基础。多年来，已经知道酵母能还原酮类为手性仲醇；这反应甚至已载入《有机合成》("organic syntheses") 中．Fuganti 利用观察到的肉桂醛及同系物不仅发生羰基的还原，而且还发生 C＝C的还原和醇醛缩合(图 4.5)，巧妙地扩展了这一应用。苄基片段在把底物引入酵母的代谢过程之后就成为多余的了，作为一个合成子，它起到潜在羰官能团的作用。目标分子是两种重要的天然产物，即存在于脂类中的天然抗氧剂——生育酚和有抗癌作用的抗菌素道诺霉素的一个组分——道诺胺 (daunosamine)。生育酚侧链的重复手性结构使这一合成方法合乎理想。 酵母的易得和按逻辑扩大这些反应的明显机会，应当吸引更多合成上的应用。为了与化学法比较，用钯(0)络合物作为模板来控制的碳负离子对乙烯基内酯的立体专属性加成，说明了构成生育酚侧链的另一方法 (Trost 和 Klun, 1979, 1981)。

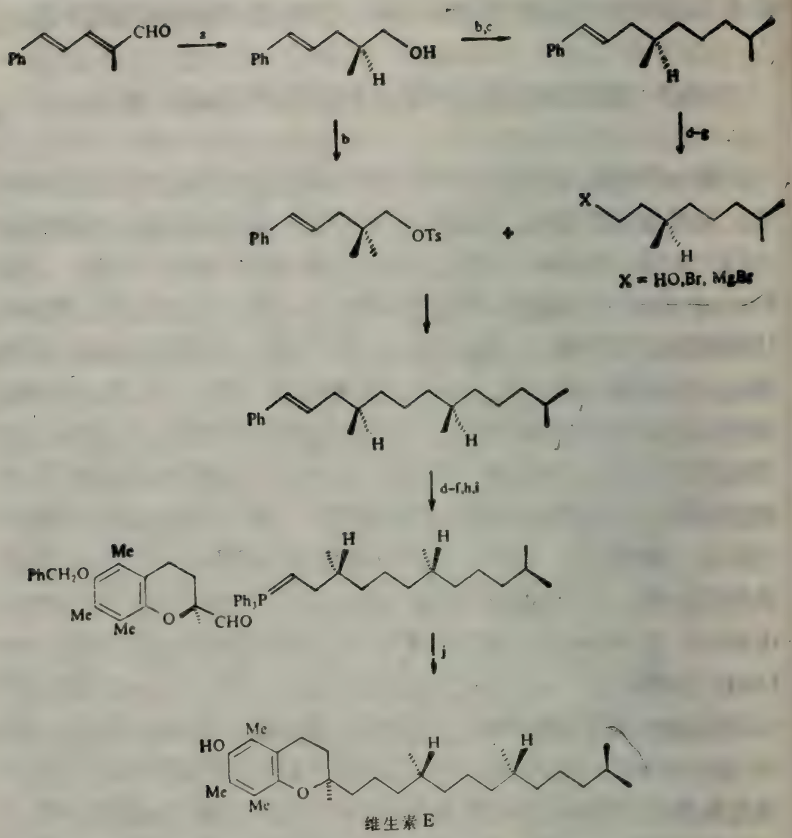


图 4.5　在维生素 E 的合成中多重应用酵母产生的手性构件
a. 发酵酵母；b. TsCl/Py；c. $BrMg(CH_2)CHMe_2$ $LiCuCl_4$；
d. O_3；e. $LiAlH_4$；f. NBS Ph_3P；g. Mg；h. Ph_3P；i. 碱；j. H_2/Cat.

模板方法将在以下讨论的仿生化学中出现.

许多酶已被如此充分地研究，以至能够可靠地预见它们在合成中的行为. 其中包括一种肽酶：胰凝乳蛋白酶，已经从对该酶专属性的研究和 X 射线晶体学的结合推导出一种活性部位模型 (Jones 和 Beck, 1976). 无疑，预见性发展的经典例子关系到前面已经提到的马肝-醇脱氢酶(图 4.1). 苏黎世 Prelog 实验室对这

个酶的早期研究最近被多伦多 Jones 的研究组引人注目地延伸了(Jones, 1980). HLADH 是一种比较不很贵的酶. 虽然在它催化底物羰基上的氧化还原反应时有手性方面的专属性，它却能接受非常多种多样的,典型的含有 2 至 15 个碳原子的有机底物. 这个酶的宽广专属性很可能反映它的生物来源是肝脏，肝脏是对属于动物代谢外来物的一些有机化合物主要负责去毒作用的器官. 很可能在同一来源中存在其它在合成上有用的一些酶. HLADH 的宽广专属性结构上的根源已认定是与催化位点相邻近的一个大的非极性口袋;这个结合部位特别适合脂环分子.合成化学家想要知道的是,他的底物是否与结合位点匹配，并且以有用的速度被 HLADH 还原. Prelog 通过供给酶以一系列取代环己酮和十氢萘酮来寻求对这个问题的解答,发现有些化合物被迅速还原、有些缓慢、有些完全不被还原. 这就有可能估计在哪个位点取代基有利于结合和还原，在哪个位点它们阻碍结合和还原. 由于环烷酮主要是由四面体碳原子构成的，Prelog 以所谓"金刚石晶格"的形式构成了一个反应活性图型 [图 4.6(a); Prelog, 1964]. 化学家可以把他的底物试着配到晶格，看看是否存在不利的相互作用.

无疑,Prelog 的工作建立了在合成中酶催化反应的可预见性，当然 Jones 是在 Prelog 的基础上开始他的研究工作的. 在当时,已认识的 HLADH 的底物只有乙醇、苯甲醛、和取代的环烷酮，那时在可能的底物中还有明显的缺欠. 比方说，醛类容易被该酶还原；如果应用标记了的底物或辅酶，就得到手性的产物. 不过,开链酮是很差的底物;而且，没有注意氧化性反应的立体化学控制. 新发现的 NAD 再循环技术使得 Jones 能够试图进行非手性化合物的氧化，并且利用酶的天然不对称性来诱导产物的手性 (Jones 和 Lok, 1979). 图 4.7 表明，非手性醇氧化得到良好产率的光学纯的内酯,发生了两个酶催化反应：第一,酶选择底物的一臂来氧化,在这一情况是前-R;第二，与醛醇处于平衡的半缩醛被氧化成内酯.

为了把一个开链酮转变为底物，Jones 用硫原子迫使该酮约

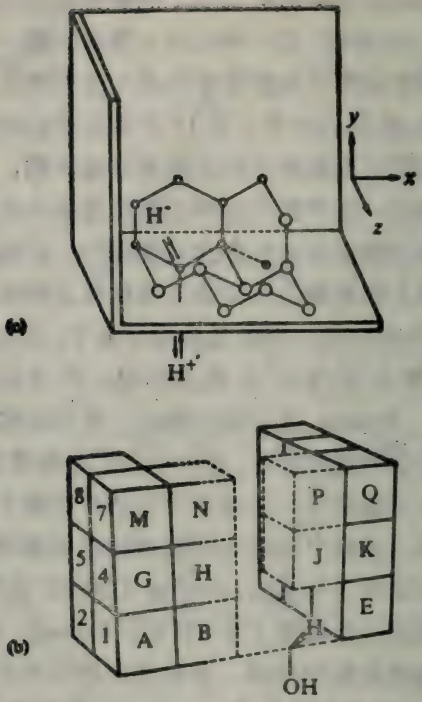


图 4.6 (a) Prelog 的金刚石晶格模型；(b)Jones 的立方体模型 Jones 的模型是从左前方观察点来看的．实线(——)包围表示禁止区，虚线(----)包围表示有限区．开放空间是利于底物结合的容许区．为了专属性分析，底物模型按同样比例尺构成．首先它的 C═O 或 CH(OH)基团按要求的取向放在位于 CI,DI 相交的底部的氧化部位．然后比较它在立方晶格中的各种取向，以便认定哪一个取向容许生成生产性 ES 络合物．

束在环中，在手性还原之后用 Raney 镍很容易地再将硫除去．由此，从酶的观点来看，一个开链酮在合成上的等价物变成了受欢迎的环烷基底物(图 4.8；Jones 和 Schwartz，1981)．

然而，以上例子展示的 HLADH 的引伸应用揭示了金刚石晶格模型预见价值的一个限制．五员环和含硫化合物不容易适合金刚石晶格的那些点．显然需要的是一个能指定哪些区域能容许取代基，哪些区域不能的模型．Jones 建立了一种基于立方空间区

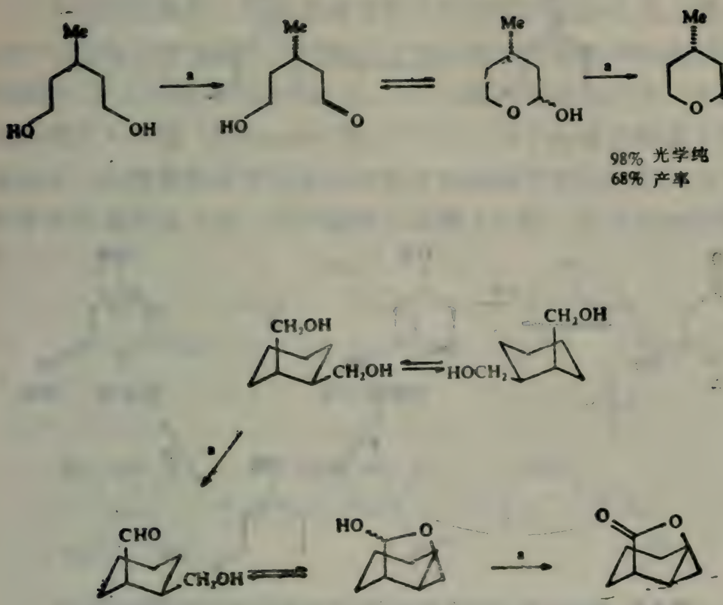


图 4.7 用(a)HLADH 同 NAD^+ 再循环产生手性内酯

划的方便模型，它使化学家能够容易地估计氧化或还原反应成功的可能性(图 4.6(b)；Jones 和 Jakovac，1982)。

目前对于合成中醇脱氢酶的了解趋近技术的理想状态。它在制备手性合成子中的范围和限度已显而易见解地确立，以至能充满信心地处理新反应。许多新的化学试剂还没有这么好地被描述，希望将来有更多的酶得到同样评价。

4.4 "竞争"中的酶和化学试剂

从以上讨论得知，毫无疑问生物化学合成方法是遵从有机化学通常逻辑过程的。现在来考察在天然产物合成和有关生物合成研究中用标记前体的合成这样严峻的竞技场中生化方法与化学试

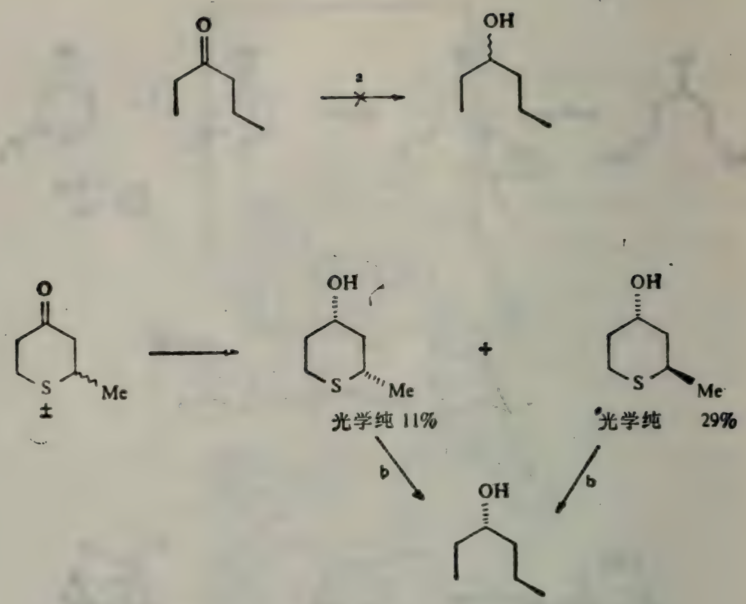


图 4.8 应用(a)HLADH 附带 NAD^+再循环(进行到50%完成)和(b)Raney 镍合成手性仲醇

剂竞赛的结果如何. 有三个领域要考查，合成子制备和官能团的修饰，而首先要讨论的是手性同位素标记化合物这个生物合成上的重要领域.

4.4.1 手性同位素标记

手性同位素标记化合物的合成是首先认识酶的立体选择性之意义的领域之一. 实际上,酶在前手性中心的选择性,重要的最初证明就需要应用同位素标记. 作为一个例子，已经叙述了苯甲醛的还原. 有关的取代苯甲醛的反应在用于生物碱生物合成研究的一些前体的合成中特别有价值 (Battersby 和 Stauton, 1974). 应用氘化和氚化苯乙胺有可能阐明生物碱生物合成中苄羟基化的立体化学历程. 但是,一个不时常讨论到的例子是用来研究β-内酰胺抗菌素生物合成的 [^{13}C]-缬氨酸合成，这一问题将在第七章以不

同的角度来考察.

手性同位素标记的缬氨酸有两个恰好相对比的合成. 第一个用已知立体化学过程的化学反应，与传统的非对映异构盐的拆分相结合，引入手性 (Baldwin 等，1973)，第二个反应利用一个酶催化步骤引入手性 (Kluender 等，1973). 两个合成在概念上都相当简短，但需要许多官能团的变换才能得到所要的产物. 对于产生手性有重要意义的一些步骤表示在图 4.9 中. 在这两种情况下

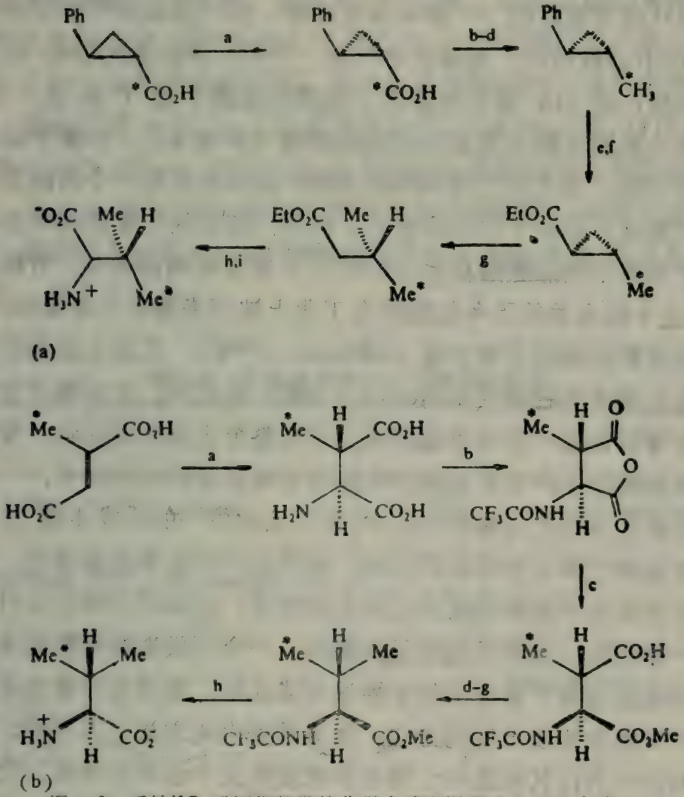


图 4.9 手性 ^{13}C-标记缬氨酸的化学合成和以酶为基础的合成

(a) Baldwin 合成. 试剂: a.拆分的奎宁盐; b.$LiAlH_4$; c. MsCl, d.$LiAlH_4$; e.O_3; f.CH_3CHN_2; g.Li/NH_3; h.PCl_3Br_2; i.NH_3.

(b) Sih 合成. 试剂: a. β-甲基天冬氨酸酶附带未反应原料的循环; b.CF_3CO_2H; c.干燥 MeOH——所示为主要产物(80%); d.B_2H_6; e.MsCl/吡啶; f.NaI/丙酮; g.Pt/H_2; h.HCl 水溶液.

引入手性都涉及后来被还原为甲基的羧酸，Baldwin 的化学方法依赖反-2-甲基环丙烷羧酸的立体专属性还原(步骤g)产生手性异丙基：开环反应的立体化学历程通常是完全确定的，而且是有机合成中控制立体化学的可靠方法．虽然这一合成给出一个手性异丙基(100%光学纯，93%[^{13}C]-标记)，而另一个在 C－2 的手性中心的生成却没有得到控制，因而得出非对映体的混合物．不过，混合物的应用对随后的生物合成实验的影响极小，因为合成青霉素的酶只接受天然的 2*S* 异构体为底物；另一异构体可能结合到酶上，但不会被转变．还存在合成含一个手性异丙基的(2*S*)-缬氨酸的挑战，而 Sih 应用甲基天冬氨酸酶迎接了这个挑战．这个酶催化氨加成到甲基富马酸的烯双键（步骤 a)。如果甲基是[^{13}C]标记的，那么由于受到酶的控制，氨从底物的一个对映面进行反式加成，在两个中心都生成 *S* 构型．随后的化学修饰得到手性同位素标记的缬氨酸样品，90%[^{13}C]-富集和对映体纯．有趣的是，与这个酶有关的天冬氨酸酶在工业上被用来合成天冬氨酸，它在强化食料和饲料上有价值（Chibata，1978)．工业上应用的酶制剂存在于大肠杆菌（Escherichia coli）细胞内，大规模孤离酶的价值导致日本一些科学家研究固定化整个大肠杆菌细胞．按这种方式用酶法生产天冬氨酸的成本降为罐式发酵法的60%．

在多数手性化合物的合成中，可以认定单一的合成步骤，是控制合成最终立体化学后果的关键．有时在一个化学法合成中，不论由于立体电子的原因或者几何上的拘束，开环或闭环反应只能采取一种历程，这种反应就是关键的．一个可供选择的控制手性的方法是应用有严重位阻的手性试剂或底物．合成化学家总是围绕这个关键步骤设计他的方法．如果是用生化方法引入手性，就没有对这一方法其他选择；酶促步骤就是这个合成的焦点，它左右随后的步骤．像以上叙述的缬氨酸的情况和酵母在合成中的应用那样，由一个酶产生两个手性中心是常见的．在这方面，生化方法又一次能与传统合成中广泛应用的立体化学上受控的开环反应相竞争．因此，为了制备同位素标记化合物，生物化学法是化

学法有用的替换物. Whitlock(1976)关于这一课题较详细的综述中讨论了另一些例子.

4.4.2 手性中间体的制备

上面我已提到在合成中产生手性中心所包含的一些步骤的意义以及围绕一个关键手性中间体的设计. 当然,手性的引入不一定通过同位素标记,而且在多数情况下是不需要标记的. 用酶进行手性还原的例子很多,如表 4.1 中所列. 这些反应的普遍的某些特点值得注意. 虽然像我们已看到的,化学试剂可以实现单官能团化合物中羰基的手性还原,而存在多官能团时,通常酶较为有效. 酵母还原 α-和 β-二羰基化合物的能力(Deol 等,1976)与前一章中所述 Ohno 的仿生手性 NADH 类似物可以作很好的对比. Simon 等(1981) 报道的烯醇化物还原酶的一些性质在这一点上是很引人注目的;这个酶能接受多种多样的结构,并且能够同时引入两个手性中心.

表 4.1 可普遍应用的一些酶催化反应

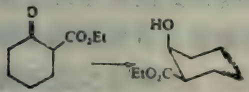
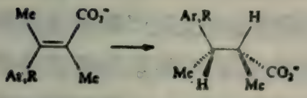
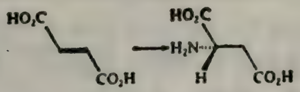
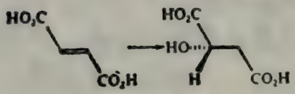
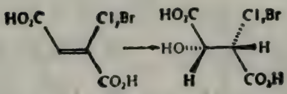
反 应		酶	参 考
ArCDO ⟶ ArCHDOH	*S*	HLADH	Jones 和 Beck(1976)
$ArCOCO_2Et$ ⟶ $ArCH(OH)CO_2Me$	*R*(−)	酵 母	Deol 等(1976)
	S(+)	酵 母	
	*Cis*	酵 母	
		烯醇化物还原酶	Sinson 等(1981)

表 4.2　一些酶催化立体专属性加成反应

反　　应	酶	参考
	天冬氨酸酶*	Chibata (1978)
	富马酸酶	Hill 和 Teipel (1971)
	富马酸酶	
ArCHO ——→ ArCH(OH)CN (*R*)	β-羟基氰基裂解酶*	Becker 等 (1965)

(有＊号标记的曾在 kg 规模进行)

酶催化加成反应对于引入手性也很有用(表 4.2),不仅像我们已经看到的引入氨基酸,也可引入羟基酸,特别是苯甲醛的氰醇中.最后这个例子已用化学模型来模拟(见下),但是,就实用的合成来说,酶更优越.可注意的是,这个酶还已经以固定化的形式大规模地被应用,它能接受广范围的脂族、芳香族和杂环族的醛.

第三类用酶产生手性的反应关系到酯和酰胺的水解.这种情况从外消旋混合物得到的最高产率只有 50%,因为酶仅能水解一种对映体,剩下的另一种对映体不变.初看起来这似乎是浪费,但是回收的原料可以外消旋化和再循环,最终得到高光学纯度和高转化率,现在这一工作已引伸到 β-氯乳酸和缩水甘油酸酯 (Hirschbein 和Whitesides, 1982).在任何情况下,产率至少能与传统的非对映体盐的拆分同样好.在复杂的天然产物合成中,通常发现这种酶催化步骤放在反应序列的开始阶段,这里产率损失比较小. Wellcome 的一组化学家进行的手性氮前列腺素的合成是这方面的典型的例子 (Caldwell 等,1979;图 4.10).所用的脱酰酶

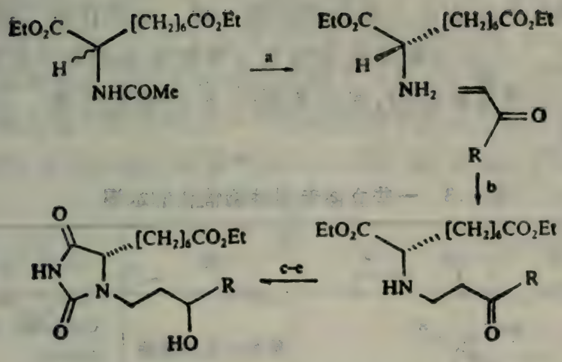


图 4.10 用酶产生的合成子的立体专属性氮前列腺素合成
a.猪肾酰基转移酶；b.烷基、支链烷基、环烷基；c.$NaBH_4$；
d.HNCO，e.H_3O^+.

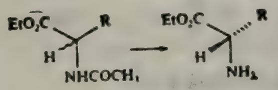
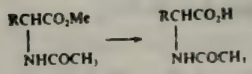
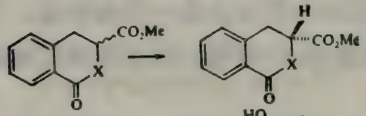
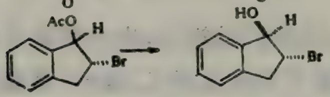
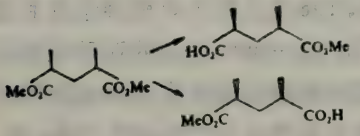
对于氨基酸有宽广的专属性，从这方面看在合成中很有价值. 另一个对拆分带芳香 α-取代基的氨基酸有用的肽酶是胰凝乳蛋白酶.

在上述反应中，手性是引入酯和酰胺的酸组分，迄今用酶法拆分手性醇的酯很少得到成功，只报道了取代 2，3-二氢-2-茚醇衍生物一个酯的一个例子(Kawai 等，1981). 偶尔有极难预期到的底物被拆分了，例如 Reid 等(1967)证明一种外消旋的亚硫酸酯可以用胃蛋白酶来拆分.然而，最通常的底物是羧酸酯，Sih 的研究组把已有技术引伸到一次培养产生两个手性中心(表 4.3；Chen 等，1981). 这些半酯很容易被转化为高光学纯度的对映体内酯.

在 L-氨基酸的工业生产中应用酰基转移酶是工业酶化学的典范之一. 早在 1953 年日本一些科学家就用从霉菌(Aspergillus oryzae) 得到的一种酰化氨基酸水解酶来水解酰基 DL-氨基酸(Chibata，1978). 这个酶结合了高催化活性和广阔的底物专属性，这是为了应用于合成的一些理想性质. 早期工作是用间歇式过程进行的，但孤离酶和纯化产物所花费的劳动大，妨碍了运转效果. 这种困难刺激了固化酶的最初发展，不仅研究了像酶稳定性和效率这样一些化学因素，也着手解决大规模生产酶的一些新的

工程问题． 因此现代生物技术的主流之一的源头就是这一工作．像前面提到过的固定化大肠杆菌细胞一样，用固化酶节省操作成本 40%以上． 工业过程中也用酶来水解较复杂结构中的酰胺；青霉素侧链的选择性断裂时，保留重要的 β-内酰胺不变，可能是最熟知的例子．

表 4.3 一些立体专属性酶催化的水解

反　　应	酶	参　　考
	猪肾酰基转移酶	Caldwell 等 (1979)
	胰凝乳蛋白酶	Jones 和 Beck (1976)
	X=CH$_2$,NH,O 胰凝乳蛋白酶	
	*Rhizopus nigrtcans*	Kawai 等 (1981)
	猪肝 *Gliocladium roseum*	Chen 等 (1981)

除某些还原反应之外，目前这些合成手性中间体的生物化学方法还没有好的化学竞争对手．化学家用了大量才智，利用容易得到的手性天然产物（氨基酸、糖类、萜类等）作为合成中的中间体或提供不对称转变的手性模板（Szabo 和 Lee，1975）．显然应用生化试剂可以大为扩充，用于有机合成的手性构件的范围．在结束这一节时，将略述 Jones 研究组应用 HLADH 化学的天然产物合成中的一个例子．已报道昆虫信息素（grandisol）的几种合成，但就产率和产物的光学纯度来说，这一合成是迄今已实现的最

好的一种，而它的成功完全依靠起初的 H-ADH 氧化生成手性内酯(4.1，图 4.11). 一旦手头有这个化合物，要得到 grandisol 就只是中间体的精心制作和转化的问题了 (Jones 等，1982). 酶对于产生手性合成子的应用另一个雄辩的例子是从用酶法还原由十氢萘酮合成(＋)-4-异三环癸烷酮 (Dodds 和 Jones，1982).

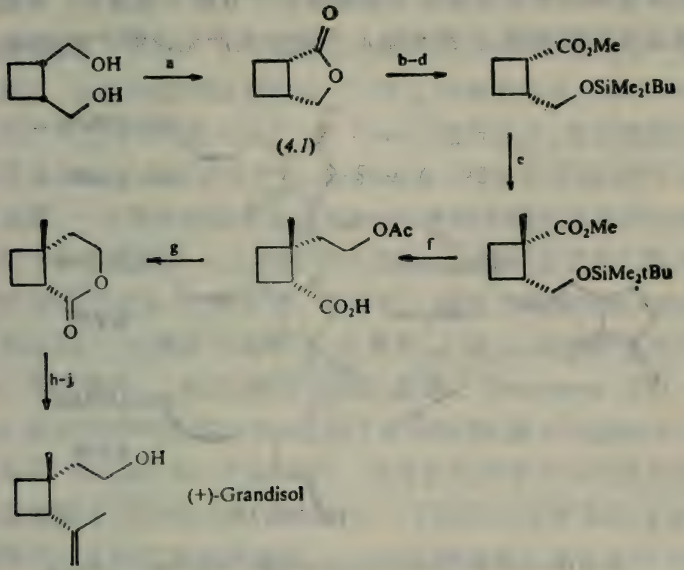


图 4.11 Jones 的 grandisol 合成

a.HLADH; b.KOH; c.CH_2N_2, d. t-$BuMe_2SiCl$; e.LDA，MeLi; f.由 Wittig 反应和硼氢化延长上面的侧链以及由脱保护和氧化修饰下面的取代基的几个步骤; g.5%H_2SO_4; h.MeLi; i.Ac_2O; j. $LiAlH_4$.

4.5 后阶段官能团的修饰

如果说一个合成总体的成功关键是依赖于方案，特别是包含手性的时候，要使一个完美的方案变为现实，还有赖于化学家选择性地修饰分子中官能团的能力. 在这种合成的后阶段，困难时常集中于要在远离例如环等等控制元 (control elements) 的位置引

入孤离的手性中心；类似的反应基团的区分已采用适当的保护基团得到控制．但是没有理由说酶不能同样地用在合成的这一方面，而且在有些情况下它们已经比手性化学试剂更有效．例如，在一个前列腺素合成中，Sih 等(1975)(图 4.12)发现不能用一个已在别处取得成功的手性铑膦络合物选择性地还原环戊三酮．关于使用微生物的经验提醒他预期生物化学方法可能成功，果然通过选择适当的微生物，已经能随心所欲地生产无论哪个对映体．

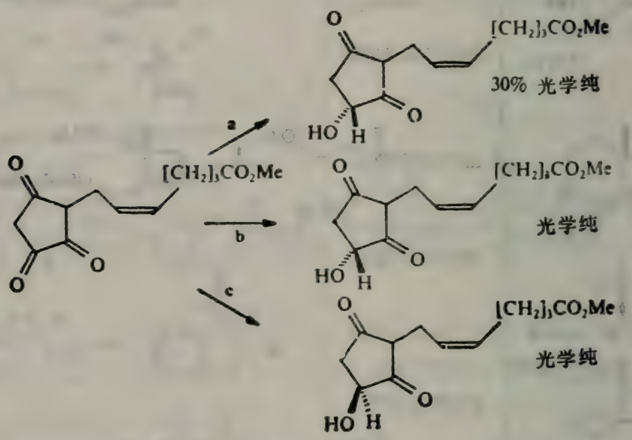


图 4.12　用化学法和微生物法的前列腺素前体对映体选择还原
a.手性铑络合物；b.*Dipodascus uninucleatus*；c. *Mucor rammanianus*.

读者现在可能熟悉了酶通过把反应物一齐放到所要求的并列位置来控制选择性的见解．或许与这一方法相应的最成功的化学方法是应用立体位阻来阻碍试剂对底物特定部位的攻击．甾体的 β-面没有反应活性是利用这一现象的最初实例之一．然而化学家发展了这一方法，达到了选择性与酶匹敌的手性还原(Krishnamurthy，1974)．像环烷烃这样一些简单底物可以用复杂的硼氢化物，如三-*s*-丁基硼氢化锂或钾之类高选择性地还原，显然这样庞大的试剂的进攻从分子位阻较小的一边比较容易发生，例如，生成轴向的醇(图 4.13)．在让庞大的试剂产生选择性之外，作为一个可供选

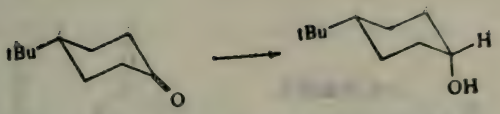


图 4.13 受构象制约的环烷酮类用酶法和化学法的还原
a.HLADH,NADH:95%顺式; b.LiHB(*s*-Bu)$_3$:96.5%顺式.

择的替代,也可以把一个大基团引入底物中,暂时阻碍从某一方向的进攻。 在控制前列腺素体系 C-15 上还原的立体化学历程中,就利用了这些手段(图 4.14). 在 Corey 的方法中,侧链的酮用一个具高选择性从背面进攻产生 S-异构体 (92%光学纯)的手性硼烷来还原. 无论谁耐心地阅读 Corey 的论文都不仅能领会达到这样的选择性需要多么大量的实验工作,也将体会试剂的选择能够怎样地不可预见,已经证明,如果有一种适当的酶存在,它是可以被预见的. 可是这些困难并没有阻止别人试图赶上或胜过 Corey 的选择性. 应用庞大试剂的策略,Yamamoto 还原一个 Corey 的封阻中间体的近亲,达到了类似结果(图 4.14;Iguchi 等,1979),而 Noyori 等(1979)声称,应用位阻非常大的手性联萘基铝酸酯得到了更好的结果(图 4.14). 下面的仿生体系的讨论中,我们将再一次遇见手性联萘基. 所有这些依靠立体位阻的方法,一个实验上共同的特点是: 在低温,通常在-78℃以下进行反应是重要的,否则热能就足够克服引入庞大基团的位阻.

可能有人认为,在产生手性中间体上酶比化学试剂优越,但是在后阶段的官能团修饰上化学试剂较有效. 这样明确的区分,作为一个粗略的概括可能有某种有限度的价值,但事物极少这么简单. 应用手性硼烷所需要的低温和非极性等条件不会适合一切底物. 虽然衍生物常常能够克服溶解度问题,但最好是依据各自的特点来处理每一个别情况. 毕竟,有些酶催化反应还没有化学试剂竞争者的例子,比如 Simon 的烯醇化物还原酶. 同样,也有化学选择性有优点的情况. 最近一个有趣的例子提示,化学法和酶法还原许多可能的交相作用. Krishnamurthy (1981) 曾证明,位

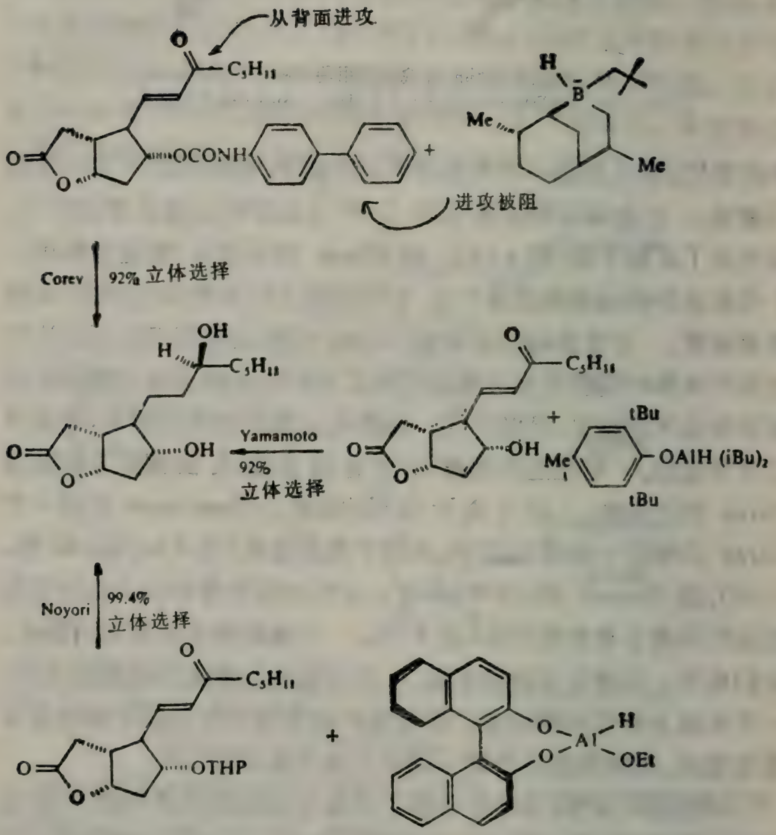


图 4.14 在前列腺素合成中使烯酮还原的几种化学方法

阻很大的铝酸酯——氢化三-3-乙基戊氧基铝锂，甚至在低温还原无位阻的环烷酮时也太庞大，但它能够还原一些醛(图 4.15)。考虑目前对 HLADH 选择性的了解，推测一下如何实现图 4.15中其他几个转变，是很有意义的。

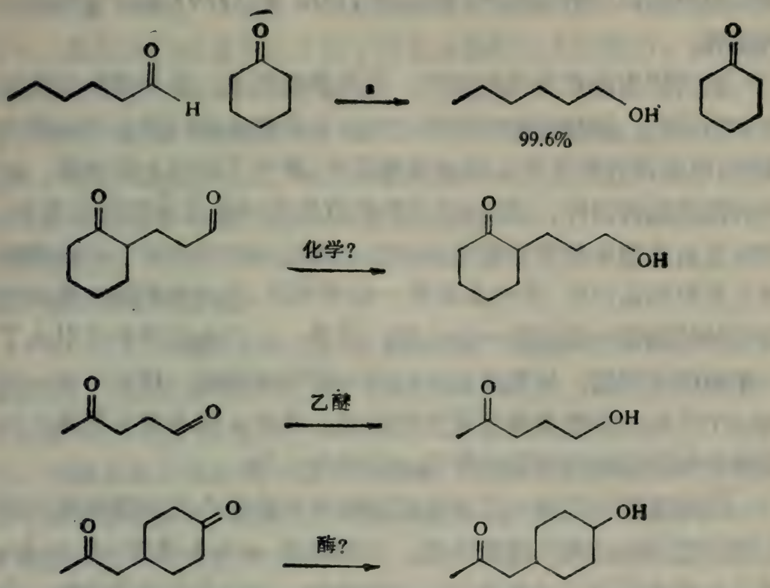


图 4.15　用位阻氢化铝和某些化学/酶选择性反应
a.$Li(Et_3CO)_3AlH$, -78℃, 3h.

4.6　合成中的仿生化学

当化学家自觉地根据一个天然体系化学的某个特点设计他的程序时，就可以说这一研究是"仿生的(biomimetic)". 该体系可能是输运机构、生物合成途径、一组受体、一个核酸、或者一个酶. 为了本章的目的，我们关心合成上有用的仿生化学. 依据生物合成途径，模拟其合成方法，即所谓生原型合成，已经有很多撰述 (Scott, 1976; Suckling 等, 1978)，但对眼前的讨论有意义的是，比较用于单一合成步骤的酶和试图以某种方式从对酶机理的了解得到裨益的仿生反应这两者的得失. 化学家认真试图通过酶的模拟来获得选择性，是比较新近的发展. 尽管 Emil Fischer 早就抱乐观态度

（见第一章），但它的发展很大功劳应归之于 Ronald Breslow；他所写自己工作的两篇综述(Breslow，1972 和 1980) 是这一领域中的路标.

通向仿生体系有几种途径. 在许多情况下，目标同酶的催化效率相匹配. 虽然这种工作通过突出重要概念而已对主题有重大影响，但强调对硝基苯基酯的水解反应，降低了合成上的价值. 这种局限性也有例外，可以从试图实现立体选择性反应的情况看到. 实际上合成仿生化学的要点是把底物通过某种形式结合到酶模拟物上来控制选择性. 像在本章前一些节那样，在适当的地方将与密切相关的酶催化反应作一些比较. 但是，在仿生化学中又引入了一个新的灵活度. 虽然反应是以酶化学为依据的，但却不必一定有一个已知的酶能催化所研究的反应. 因此，较有意义的是在仿生体系与按传统设计的化学反应之间作比较.

已经发现几个能为仿生合成提供有用的结合的关键体系. 首先被广泛研究的是环糊精体系. 环糊精是 α-1,4-连接，含六、七、或八个葡萄糖分子的葡萄糖环状低聚物. 它们有花环状结构，具有羟基的外套和大体上非极性的内腔(图 4.16)，能在内腔中包结非极性底物，使环糊精具有有用的仿生性质. 其次，冠醚类已发展

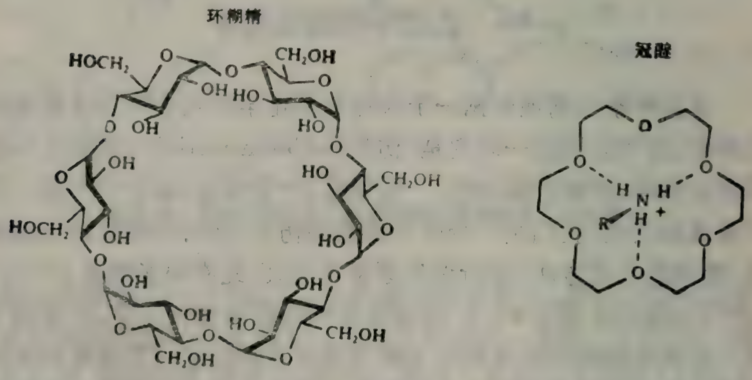


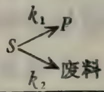
图 4.16　仿生体系的某些构件

为一门丰富的化学学科．最初被报道的这类分子是乙撑氧的大环衍生物(图 4.16)．与结合非极性底物的环糊精不同，冠醚能络合离子．最初它们的重要意义在于结合金属阳离子的能力，而也能结合伯铵阳离子的发现又开辟了它的有机化学．更近一些，还报道了能结合阴离子的类似物．第三个主要类别的仿生体系不那么明确，不过与胶束有关．对这种像清净剂一样分子的多分子聚集体的结构还有争论，但是像我们将看到的那样，它们具有确实有趣的仿生性质．在这几个主要类别之外，还研究了其它几个体系，值得注意的有小的多肽．

任一个以上概述的体系，其控制选择性的要领都是有序的结合底物．一切类型的化学力都可用来控制结合，在最初成功的仿生合成中，用共价键将试剂以特定方式连接到底物，例如一个甾体上．冠醚基本上依靠离子键或配价键．但是比较弱的化学作用力也可以是重要的，环糊精主要用疏水键合，而胶束体系把离子和非极性相互作用与氢键混合起来了．换句话说，所有酶能应用的力也以某种形式被仿生化学所应用．

如我已说过的，仿生合成是比较年青的领域，许多被叙述的例子是先驱性的．从实验室规模合成的观点看，传统化学技法和酶法可能时常有利，但是如果能想出简单而有效的选择性仿生体系，它们将在工业规模上很有意义，并可能与固化酶和遗传工程制剂竞争． 乍看来，仿生体系选择性的目标似乎高不可攀，但正如 Guthrie (1976) 所首先指出的，即使产率不太大的增加，在工业上也可能很重要． 试看表 4.4 所列数据，说明底物 *S* 转变为产物 *P* 和不需要的副产物这样一个简单情况．随意假设90%产率可以被接受，表 4.4 清楚地表明，小到 10 至 1000 倍的改进就可以很有用．由于酶的催化效力通常估计在 10^5到 10^9之间，只要在仿生体系中仅利用酶选择性的一小部分就可能很有价值． 带着这一鼓舞，我们可以进而讨论合成仿生化学．

表 4.4 底物 S 转变为产物 P 和不需要的副产物



k_2/k_1	无催化作用的产率,%	95%产率所需催化作用	典型反应
1	50	9	芳香取代
9	10	81	
99	1	891	脂族自由基取代
199	0.5	1791	
0.25	80	2	
0.11	90	11(对99%产率)	

4.6.1 选择性的共价控制

在合成中应用环体系来控制立体选择性一直是一个主要方法(Norman, 1982). 六员环的构象导致充分了解立体电子效应,对它的研究一直特别重要,像小环的打开能解除几何上强加的拘束那样.但是,在 Breslow 开始对甾体官能化的仿生研究以前,对于应用大环来控制合成中位置选择的可能性几乎没有加以注意. 多年来就已知道,微生物能够在甾体环系的未活化位置上进行专属性的氧化. 很明显,选择性的控制是由底物特异性地结合到酶的活性部位来保证的, Breslow 的目标就是构成一个简单的化学体系,把试剂放到相对于刚性的甾体环系的特定位置(图 4.17). 最容易受到攻击的饱和碳原子是 C-9,C-14,和 C-17 的叔碳中心. 在这些中心的氢原子都是 α 和轴向的,因此能被从 α-面趋近的自由基夺去. 那末,问题就归结为把试剂放到适当位置了. 将取代苯酮通过酯链节连接到 3-羟基官能上,再用光化学法引发夺氢作用的一些实验,表明此法是可行的. 这种技术已发展成为一种用取代的碘苯或二苯基硫醚的合成氯化过程,这些试剂把氯原子放到靠近随便哪个目标氢原子. 策略地安放的氯原子除去靠近它的氢原子,通过氢原子的转移引发一系列反应. 叔自由基与另一

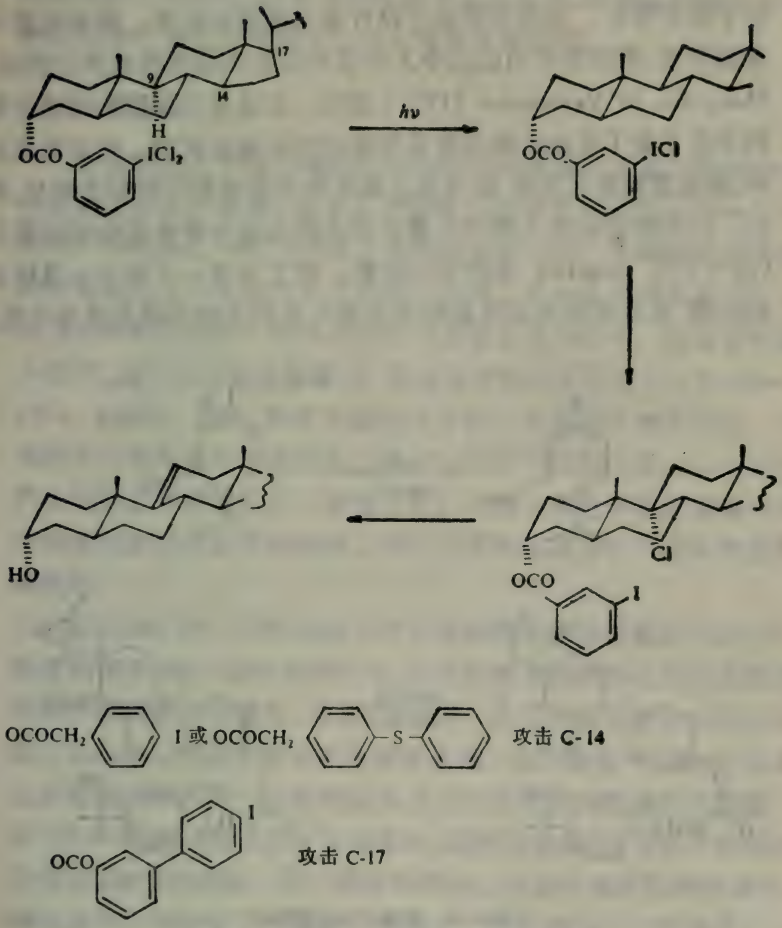


图 4.17 Breslow 的甾体合成中的定向氯化

氯原子配对，得出选择性取代的产物. 如果采用稀溶液减少分子间反应的机会，能得到高选择性. 实际上，如果带着氯原子的悬挂链长度超过甾体环系，就不发生反应. 然后，氯化的甾体可以进一步转变为烯，在 17-氯代化合物的情况，能够降解侧链，导致有价值的合成甾体激素的前体. 这些技术的最近发展已实现甾体的催化多重氯化 (Breslow 和 Heyer, 1982).

为了与酶催化反应作直接比较，若能够像氯一样插进一个氧原子就非常好．虽然主要由于设计适当试剂的困难，羟基化至今未能实现，但环氧化可以在令人注目的长距离选择性地加以控制．Sharpless 和 Verhoeven (1979) 证明，在过渡金属钒和钼络合物的存在下叔丁基氢过氧化物是很有用的环氧化试剂．在这些反应中，金属起到模板作用，既与氢过氧化物也与底物中的羟基配位．例如，法尼醇或牻牛儿醇中最靠近醇基的双键能够专属性地环氧化(图 4.18)．Breslow 修改他的模板，使之包含一个能与金属结合的叔醇．这样就使对甾体底物中遥远位置的直接环氧化成为可能．

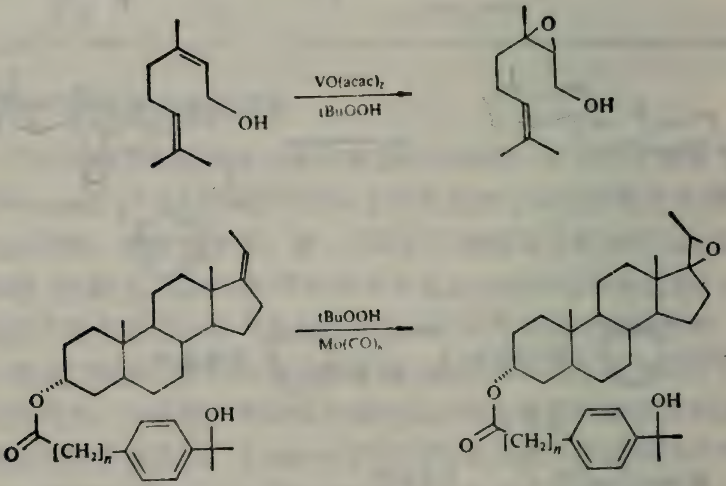


图 4.18　模板定向的环氧化

$n=1$ 发生环氧化，　$n=2$ 无反应．

具有刚性环结构的甾体是这类仿生方法的理想底物．模板体系行为的可预见性也是一个优点，但是，类似技术应用到较柔性的分子时，总是最终产生混合物．虽然烷烃选择性末端羟基化可以由微生物完成，但简单的烷烃选择性官能化的问题，即在用于洗涤剂和增塑剂的伯醇生产中有重要工业意义的问题，还有待于由仿生化学来解决．如已提到过的，甾体的羟基化反应多年来已用于皮

质甾体的工业合成，但是尽管有相当大的效益，简单脂肪族化合物的微生物羟基化至今没有在商业规模取得成功.

4.6.2 环糊精

发展目的在于模拟酶的高加速作用的体系一直是环糊精结合性质的主要应用领域. 这方面的研究已取得惊人的成功(Breslow, 1980; Tabushi, 1982);合成上的研究尚不很多. 环糊精花环的内腔有合适的大小来结合单环和双环芳环，例如苯甲醚和其它带小取代基的苯衍生物，结合后使取代基被埋进内腔中. 在环糊精络合物中，通常对位是最暴露的，能被适当的试剂所攻击 (Breslow, 1972, 1980). 因此，当苯甲醚的络合物与次氯酸溶液反应时，环糊精周边的羟基与次氯酸盐交换，生成处于理想位置以高选择性产生对位取代的氯化剂. 有趣的是，与这一氯化作用最紧密相关的酶催化反应的选择性较差，接近于无环糊精存在下用次氯酸所得比值.

Tabushi 等(1979)报道了用环糊精络合物选择性取代的一个罕见的情况；对于所研究的反应，最密切相关的酶催化反应是酚类天然产物的异戊烯基化，但是，催化这一反应的酶看来没有经过孤离. Tabushi 对维生素 K 的合成有兴趣，他需要在 O-或 C-烷基化方面催化和控制一个酚的烷基化. 他得到解决的途径是将萘二酚(图 4.19)用环糊精络合再烷基化，同时发生氧化，导致所需要的中间体，取代的萘醌. 动力学分析表明，烷基化被环糊精所催化，同时络合作用防止了产物进一步氧化. 萘酚烷基化的选择性，如下面将要叙述的，也能被胶束体系所控制.

应用环糊精衍生物也可能有立体选择性，虽然选择性的根源还不清楚. Breslow 发现连接到 β-环糊精上的吡哆醛，在催化芳香 α-酮酸转变为相应的 α-氨基酸的转氨作用中很有效(Breslow 等，1980). 观察到对于带有能结合进环糊精内腔的芳基的酮酸有优先的反应活性，而且在这种情况下，对映体选择性也高. 环糊精化学一个潜在的很有意义的合成上的应用关系到 Diels-Alder 反

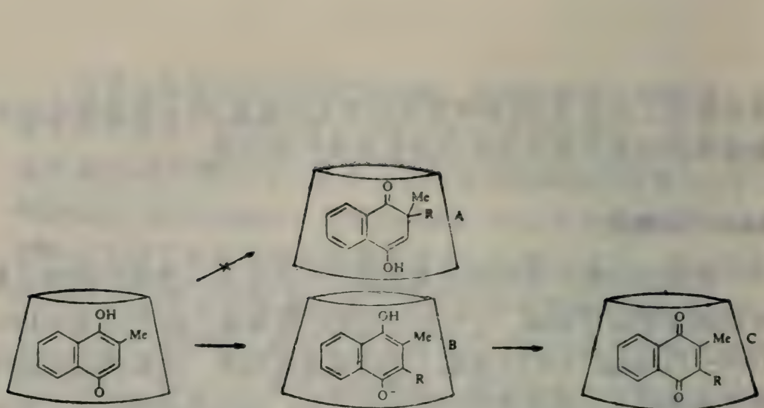


图 4.19 环糊精对于萘二酚氧化和烷基化的多重催化效应
R=$CH_2CH=CH_2$, $CH_2CH=CHCH_3$ 或 $CH_2CH=CMe_2$
A.烷基化生成这一化合物位阻太大; B.环糊精增加阴离子浓度,催化烷基化作用; C.萘二酚被 O_2 氧化,同时产生 H_2O_2; 环糊精防止萘醌被 H_2O_2 进一步氧化.

应 (Rideout 和 Breslow, 1980). 在两种反应物能一起络合进环糊精内腔的一些反应中,发生显著的催化作用,在这种络合的环加成中,显然存在控制位置选择性的可能性. 在离子型清洗剂的溶液中也观察到类似的速度的增加,从下述胶束体系的角度看,这是一个有趣的现象.

以上少数例子证明了环糊精在合成上的应用. 看来环糊精体系在能接受为客体的化合物范围上有些局限. 因为微生物产生的环糊精有三种大小的环,内腔直径可以在一定限度内挑选,虽然迄今还不容易改变它,不过,已经发展出增加或减少内腔深度的合成方法,由此修改底物专属性,至少就酯水解反应而论是如此. 把修饰环糊精应用于合成是某些实验室活跃研究中的课题.

4.6.3 冠醚

早在 1967 年已经认识到最初的一些冠醚结合无机离子的能力,不久又发现,离子半径最接近匹配给体氧原子之间可用空间的阳离子有最强的结合. 对含有六个给体氧原子均衡分布在二亚甲基桥之间的冠醚与钾离子特别强地结合. 由于铵离子有类似钾的离子半径,发现能制备稳定的铵离子络合物就不足为奇了. 然后,

仅仅跨一小步就表明伯烷基铵阳离子也能结合,由这一结果,发展了冠醚的有机化学.Barrett 等(1980)报道了冠醚结合伯铵阳离子的能力直接在合成上的应用. 虽然伯铵阳离子主要借助于三个氢原子的氢键能与配体的三个给体氧原子相结合,而仲铵阳离子要与配体络合既太庞大,形成氢键的能力也太差. 因此能够在仲铵阳离子的存在下用冠醚选择性地保护伯铵阳离子. 然后进行不对称酰化,产率大大地改进,远胜于对比的未控制的反应(图 4.20).

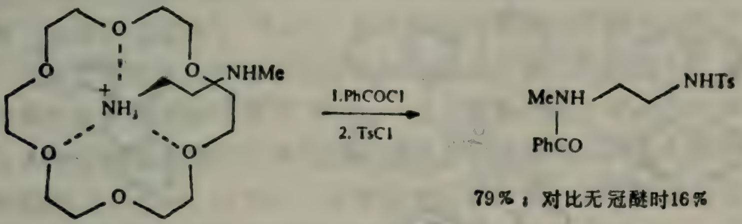


图 4.20 冠醚控制的二胺的酰化

冠醚化学中一个有兴趣的主要领域是把手性引进大环醚中. 由糖类衍生物得来的一些二醇可以转化为冠醚, Cram 应用手性联萘二酚(图 4.21; Cram,1976) 特别有效果. 这些化合物中的手性,象联苯一样,是由于绕中央 C—C 键的旋转受限. 这些配体的最初应用是在与氨基酸衍生物生成对映体选择性络合物的情况. 应用一个U型管输运仪器,能够实现外消旋氨基酸的拆分,类似于前述专属性酯酶的应用. 最近,证明了甲基乙烯基酮的不对称 Michael 加成反应 (Cram 和 Sogah, 1981), 大大扩充了这些手性冠醚的潜力. 虽然类似反应在以前应用手性生物碱提供不对称诱导时已经进行过,但冠醚介导的反应,最好的例子能以几乎完全的立体选择性进行. 应用钾的烯醇化物作为亲核剂, 以便能生成一种宿主-K^+-底物$^-$型络合物是重要的. 因为钾离子很强地结合到冠醚中,烯醇化物能被保持在一个手性环境中,并且加成到甲基乙烯基酮上,给出高光学纯度的产物. 像对于拆分实验一样,不对称诱导依靠冠醚络合物达到了目的, 其中宿主和客体上的庞大基

团之间主体相互作用被减小了．在低温下操作和仔细挑选反应条件也是非常重要的，为的是使可能的非对映异构的络合物之间的能量差有最大的效应．比如在图 4.21 所示反应中，在−78℃，以99％的对映体超量得到产物，而在 25℃，光学纯度降为 67％．

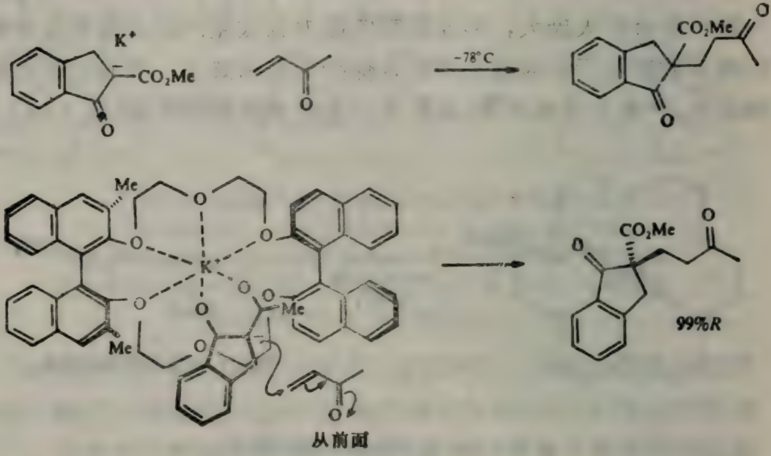


图 4.21 冠醚介导的对映选择性 Michael 加成

与环糊精不同，冠醚有人造分子的优点，它们的结构可以根据实际问题加以设计．虽然不是与合成有直接关系，但能够模拟酶的对映选择性水解和还原反应的冠醚已被合成出来．还设计了一些巧妙的分子，引进对络合能力的外部控制；光敏基团使某些化合物的络合作用能够打开或关掉．在另一些化合物中，第二个金属离子能控制冠醚的构象而再控制络合，这后一例子可以与酶活性的变构控制相比较．在结合主族阳离子的冠醚之外，还制备了能与过渡金属离子相作用的含 β-二酮的衍生物． 另一些变种通过大环胍类结合磷酸化合物，它们模拟一系列生物受体，并可构造成能容纳类似神经递质结构的双官能化合物 (Sutherland, 1982)．能够结合两个官能团的分子显然有可能结合两个底物，像这样，可能设计出一类人工酶．最近的工作表明，有可能合成离子载体的功能类似物，离子载体是细胞膜的组成部分，负责如钾、氯等无机离子的输运．因此，这类化合物的潜力比合成领域宽得多，应用于

开关装置或选择性人工输运体系是可以想得到的.

4.6.4 胶束和有关体系

与前面已考察的那些仿生体系相比较,胶束的结构尚未确定.当然,多年来已经知道,在直的脂链中碳原子数大于10的表面活性剂在水溶液中容易聚集形成胶束.用光散射测定等技术,已能较好地确定胶束大体上的物理化学性质.用光散射和其它方法已能证明,典型的胶束是由50—100个分子组成的,表面活性剂进入和离开胶束的速度大于10 s^{-1}.也已经很好地研究了胶束的电性质,胶束对有机反应的催化作用大部分是由于胶束能在端基区域呈现非常高浓度的配对离子.例如,一个由氢氧负离子促进的水解反应,可能被端基带正电荷的胶束催化,但是被端部带负电荷的胶束抑制(Bunton, 1976).尽管有些用精心挑选的探测器进行了仔细的研究,胶束的详细结构还是不能确定,这是设计引入胶束作为结合基团的合成体系一个主要缺点.最有用的一种描述出自Menger(1979),他根据光谱和模型搭制等研究,认为胶束具不规则的球形,其组分表面活性剂分子通过表面上的沟槽进入或离开胶束.水浸入这些沟槽,深达七个碳原子,从合成的观点看,想象沟槽是方便的结合底物的位点是很有吸引力的.记住上述这些困难,胶束体系应用于仿生合成的研究一直是经验式地进行就不奇怪了(Suckling, 1981).胶束体系的优点是容易形成,但是这一便利的代价是缺乏像环糊精或冠醚那样明晰的结构,可以在上面设计结合和活性位点.胶束可能在合成中有用,最鼓舞人的提示来自几个实验室,在那里已经证明,在脂族化学中,控制萜类分子的还原性汞化可以达到惊人的程度(Link 等,1980),而且亲电和自由基芳香取代也可被胶束影响.我们曾用高场核磁共振谱证明胶束能够使小的极性分子定向,如图4.22所示.如果试剂从极性的水相趋近底物,那么容易看出,怎样才能使邻位取代有所增加.在许多情况下,化学选择性与NMR谱所暗示的底物取向很一致,这些观察已开始提供设计更有效的选择性取代体系的基

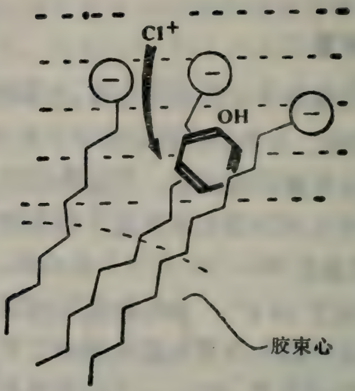


图 4.22　在胶束溶液中苯酚的取向和它对氯化的影响

础。

有两个明显的途径，都能对半有序的胶束体系增加一定程度的控制．首先，几个表面活性剂分子可以用共价键合在一起，形成带触角的分子．Menger 等(1981)首先报道了这种分子(图 4.23)；他的"六臂章鱼 (hexapus)"能使像胆甾醇那么大的分子在水中增溶．我们自己设计的触角分子到目前只能有三个臂，通过类似于

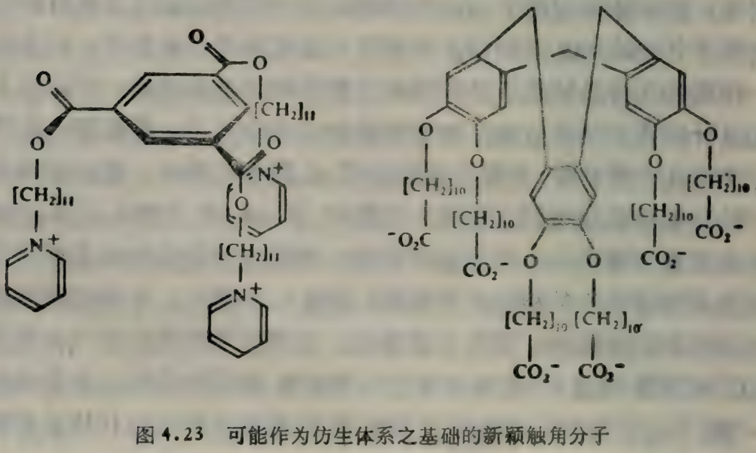


图 4.23　可能作为仿生体系之基础的新颖触角分子

在胶束溶液中所发现的抑制氯化反应，和使 NMR 谱显著改变，证明它们能够结合苯酚那样的小芳香分子 (Suckling, 1982; 图 4.23). 不过，这些分子只是选择性官能化体系的原型，因为它们具有结合位点，但还必须配备上活性位点.

第二条改进胶束体系选择性的途径是把试剂放到胶束内的确定位置上. 我们关于胶束溶液中苯酚氯化的工作最明显地证明其重要性. 如图 4.22 所示，我们已能证明苯酚被增溶化，按平均说靠近端基，使得极性的羟基指向水相中. 显然要得到选择性邻位取代，试剂必须插进胶束的大约 C-3 处. 用带一个叔醇的官能化的硬脂酸做到了这一点(图 4.24; Onviriuka 和 Suckling, 1982);

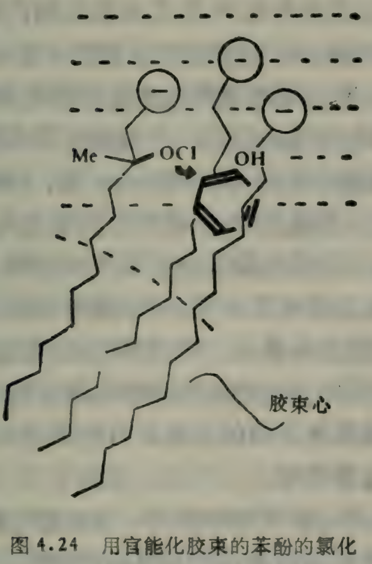


图 4.24　用官能化胶束的苯酚的氯化

来自这个醇的次氯酸根使苯酚氯化发生在接近于完全选择性的邻位取代. 从这一工作得到的最重要结论是，假如相对于底物试剂被适当地安置，即使对不那么明确的结合位点也能得到高选择性. 与传统的试剂比较，这些胶束体系原则上具有用一步进行选择性转变的潜力. 经常能设计出芳香化合物取代的冗长的合成，从以

上概述的结果发展出来的体系，能提供完美和可预见的可供选择的替代物.

在这项工作中一个突出的主要问题是设计一个能特异地插入的羟基化作用剂. 某些采用过渡金属络合物，经常是血红素，作为羟基试剂的羟基化酶是熟知的，但是这种氧化剂要引入胶束和它们的关系物就嫌太庞大和过于复杂. 然而羟基化酶本身可以有效地应用于合成，像某些从苯丙氨酸合成酪氨酸的最近研究表明的那样（Klibanov 等，1981）.

暂时离开含血红素的酶这个主题，氯过氧化酶在选择性合成中的应用是值得注意的. 在过氧化氢和氯化物存在下，这个酶催化氯作为亲电剂插入有机底物，通常是富电子的烯或芳香化合物. 最近一个有效的应用关系到环氧乙烯和环氧丙烯的大规模合成. 传统的烯烃非匀相催化氧化经常是由于氧化过头产生二氧化碳导致一定损失，反之，氯过氧酶能将这些底物转化为相应的环氧化物或卤醇，不存在氧化过头的问题. 产物是环氧化物时，氯化物还可以再生，因此也是催化反应（Neidleman 等，1981）. 反应的燃料是过氧化氢，而在工作进程中，发现可以用氧化酶改进传统的生产过氧化氢的方法，这些氧化酶从分子氧产生过氧化氢，同时氧化一个有机底物. 此后的研究已证明，可以用两个酶，氯过氧物酶和氧化酶，进行这一重要的环氧化. 有意义的是，在这里固定化酶又受到重视，此外还需要相当大的生物化学和微生物学的投入，以便拿出合适的微生物品系作为酶的来源. 可以预期，将来遗传工程会对这一领域作出重要贡献.

不难看出，怎样从胶束溶液中的一些观察发展出实用的体系. 主要要考虑便利产物的回收，因为形成乳液的表面活性剂，还原是很麻烦的. 合成胶束的高分子类似物是一个吸引人的解决办法. 虽然迄今为止我们已研究的体系没有能够对芳香取代反应再现胶束的效果，但 Brown（1980）已证明高分子季铵盐在控制萘酚类C-对O-烷基化的比值上有用. 他已证明胶束类似物的微环境效应能增加氧原子的亲核性，由此增加 O-烷基化的比例. 这个结果

是对 Tabushi 应用环糊精的观察的补充.

4.6.5 仿生的其它可能性

上述三大类结合物种之外，还发现其它分子有仿生的结合性质,将来可能在合成中找到应用. 某些用小多肽的实验已表明,可以应用环状苯丙氨酰基组氨酸来模拟立体专属性酶催化的氰化物对苯甲醛的加成 (Oku 和 Inoue, 1981).许多化学家曾试图应用仿生手性催化剂或较简单的手性相转移催化剂来实现立体选择性环氧化. 研究了通常碱催化的 α,β-不饱和酮的反应,在许多情况下,得到高的化学产率和几乎 100%的过量对映体(Julia等,1980; Wynberg 和 Marsmann, 1980). 这些反应与 Cram 的酶促不对称 Michael 加成有关.

最近,报道了几个有趣的杂交体系. Kaiser (Slama 等,1981) 把一个外来的辅酶黄素引进具有很明确结合位点的木瓜蛋白酶上. 这是一个有吸引力的配对，因为已经知道木瓜蛋白酶含有一个活性位点的巯基，而许多天然黄素酶就用硫醚键把黄素辅酶结合到活性位点上. 虽然这项工作还在襁褓期，但它已能展示黄素在不熟悉的环境中对氧化反应的高催化活性. 如我们已看到的，从底物专属性的观点已特别好地研究了醇脱氢酶，奇怪的是，它还含有丝氨酸蛋白酶的电荷替续系统,因此,想要知道是否能够使它对适当的底物起酯酶的作用是有意义的. 沸石是具有一定直径孔道或微孔的硅酸盐矿物，沸石也能制成含酸性或碱性表面催化位点. 由于它们具有控制大量的小分子烃重排和取代反应的潜力，因此已被广泛地研究. 沸石的微孔与酶的结合位点类似是显而易见的. 最近应用沸石催化果糖使氢化为甘露醇，已结合到固定化葡萄糖异构化酶上，提出了葡萄糖到甘露醇的一锅法转化，葡萄糖容易从玉米糖浆得到，而甘露醇现在用于医药上可售高价 (Ruddleston 和 Stewart, 1981).

4.7 结 束 语

近年来搞合成工作的人在评价试剂时强调了方便、预见性和可靠性等方面．我已尝试过酶和其它生物化学体系对这些要求符合得怎样．在醇脱氢酶的情况下，肯定对每个判据都可以作出正面的回答．极少数其它的酶也已经得到同样好地评定，酶所擅长的选择性转变的类型，通常对合成的成功是决定性的，因此，必定值得慎重考虑生化方法是否适合．如今为了选择转变没有理由不在与化学试剂等同的条件下考虑到酶．实际上如果能找到很好的类似性，微生物方法也会是有价值的．仿生方法怎么样呢？目前，只在少数几个情况下找到在合成上有用的例子．但是，这正是10年前酶本身的情况，而随着设计仿生体系的原理日益更牢靠地确立，在今后10年内，它们将闯进合成化学看来是无疑的．可能它们最好的工作领域是在工业化学中，在工业化学中时常需要极其完善地进行相对少数的几种反应．有的读者可能发现，前面最后几段提到的杂交体系有些玄妙，但是正是在这一领域存在着富有想象力的工作的机会，尚需要从辅酶化学(第三章)和从结构蛋白质化学(第八章)来的观念融合．一个适当的蛋白质可能提供很明确的手性环境，在其中能发生非天然的选择性合成反应．Shinkai 教授(第三章)和 Breslow 教授关于环糊精介导的狄尔斯-阿尔德反应(本章)已突出了环境控制的简单催化上的优点，因此可以期望从杂交体系得到高的性能．

第五章 酶作为药物设计的靶垛

Barrie Hesp 和 Alvin K. Willard

(Medicinal Chemistry Stuart Pharmaceutical, Division of ICI Americas Inc., Wilmington, USA)

5.1 引 言

A. Burger (1980) 把 1936 年发现磺胺的抗菌性作为现代药物化学的开始. 随后观察到磺胺对对氨基苯甲酸并入叶酸有拮抗作用，这标志着药物化学家的注意力开始从内源代谢物本身转移到控制这些代谢物在机体内转变的生物化学过程. 许多这些重要的生物化学过程都是酶催化的生物合成和降解代谢反应. 其它大多是受体介导的过程，其中一个内源配体与细胞膜上的一个受体相互作用，引发一系列复杂的生物化学反应. 从对我们自己单位研究课题的一次临时调查看，以受体机理为基础和酶机理为基础的研究规划大约各占一半. 在别的单位这种均势也不会有太大差别.

本章我们将只涉及酶作为药物设计的靶垛这一内容. 对以研究反应机理为主要对象的有机化学家来说，酶能够提供比受体更多的好处，因为我们对受体组织和机理的了解远不及对许多酶催化反应方面的知识. 我们没有详细的受体结构方面的X射线资料，只能根据已有的构成它们的分子的三维结构的知识对它们的几何形状加以推测，而酶经常已得到精制和鉴定，有时还有从X射线研究中得到的结构和机理方面的精确资料，但我们必须及时说明，像这样占有大量资料只是个别而不是一般情况. 即使推

测的成分多于事实，酶机理也符合有机化学的基本规律，而且非催化反应机理的某些知识常常是设计抑制剂的出发点，这在第二章中已有所讨论.

生命过程涉及众多的酶，但其中许多，实际上可能是大多数，不是药物干预的适当靶垛. 目前临床上使用的药物多数由制药公司进行研究.一旦鉴定出一种新药，仅在美国就大约需要 7—10 年的开发期和 5—7 千万美元的花费. 在这样经济形势下，靶酶的选择具有至关重要的意义.

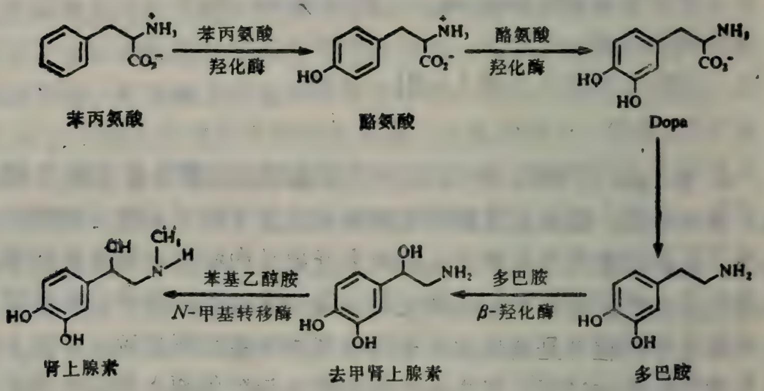


图 5.1 儿茶酚胺的生物合成

例如，考察儿茶酚胺生物合成过程(图 5.1)中的一些酶. 酪氨酸羟化酶和多巴胺（3，4-二羟基苯乙胺）β-羟化酶的一些抑制剂能降低血压，主要通过减少神经递质去甲肾上腺素的合成. 而且，由于它们本身缺乏在控制肾上腺素功能方面的选择性，这些抑制剂不能被接受为抗高血压的药物. 总的说来它们干扰去甲肾上腺素的合成，导致不能被人接受的副作用，例如由阻碍心血管反射引起的体位性低血压. 由于这一原因，对于酪氨酸羟化酶抑制剂的一些很好想法，不大可能在现今制药工业中受到重视. 另外还有别的通过肾上腺素功能机理控制血压的具有选择性的途径，例如通过阻断β-肾上腺素受体体系.

反之，随着肾上腺素在血压的中枢控制和对应力的外周生理

反应中所起作用证据的增多，肾上腺素生物合成的最后一步中的苯基乙醇胺 *N*-甲基转移酶（PNMT）越来越受到重视(Bondinell 等，1980； Fuller，1982)．PNMT 的抑制剂不会产生副作用这一点没有得到保证；我们的确可以猜想一下它们会有什么样的副作用．但是，至少原则上抑制肾上腺素生物合成的最后一步，对由多巴胺和去甲肾上腺素调节的体系的影响将不如抑制酪氨酸羟化酶产生的影响那么大．

在这一章中，我们想用五个案例的研究说明药物化学家对于用酶作为药物设计靶垛的认识的发展．每一个案例都针对被确认为重要的药物或者当今引起人们浓厚兴趣的研究课题．其范围包括从对它们的靶酶还一无所知时就开始发展的药物，到最近关于从头设计的想法．每一个都是对药物化学家有启发的丰富信息源，尽管这不是对酶抑制剂的综述，也不是我们要着手的疾病领域．最后，我们要注意蕴藏在现代计算图示法和有关技术，特别是关系到酶催化反应力能学和机理的新认识方面的潜力．

5.2 药物发现的案例研究

5.2.1 二氢叶酸还原酶的抑制剂

有几种在临床上很重要的药物是通过抑制二氢叶酸还原酶产生疗效的．二氢叶酸还原酶催化二氢叶酸(*5.1*) 的还原，二氢叶酸通过来自 NADPH 的氢负离子的转移被还原为四氢叶酸(*5.2*)(图 5.2)．许多哺乳动物和微生物，其细胞内的生化过程都利用四氢叶酸衍生物作为一碳转移反应中的辅因子，但是，作为治疗性干涉的靶子还是与胸苷酸合成酶偶联的反应系列最有吸引力，因为如果缺乏发挥作用的胸苷酸合成酶，就不能维持细胞的 DNA 合成．由于从 5,10-亚甲基四氢叶酸(*5.3*)转变为脱氧尿苷酸的一碳片段 (moiety) 的转移，与辅因子氧化到二氢叶酸水平同时发生，所以胸苷酸合成酶必须依赖于由二氢叶酸还原酶催化的从二氢叶酸(*5.1*)到四氢叶酸的不断再生（*5.2*）(Hitchings 和 Roth，1980)．

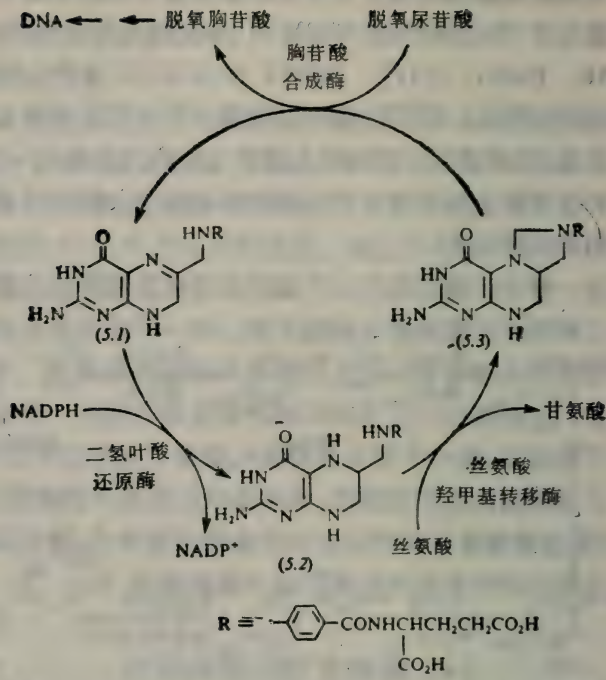
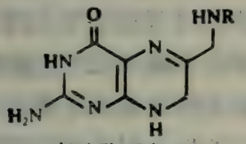


图 5.2 脱氧核苷酸（DNA）生物合成中二氢叶酸还原酶的作用

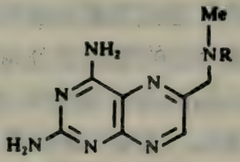
因此，在整个微生物及动物界中，二氢叶酸还原酶的抑制剂能有效地阻止细胞分裂。

在更深入地考察二氢叶酸还原酶抑制剂的作用机理之前，我们将简短地讨论它们的起源。在整个第二次世界大战中，一直急迫地寻找着抗疟药物。由于嘧啶化合物在细胞代谢中的关键作用和已知一类包括嘧啶衍生物在内的磺胺有抗疟活性，英国 ICI 的 Curd 和同事们从嘧啶类似物为基础开展合成工作。嘧啶类化合物合成的探索迅速导致以二氨基嘧啶衍生物（5.5）为典型代表的一个新系列的抗疟药物的产生，（5.5）是在将磺胺类的苯胺片段，早期抗疟生物碱的基本侧链和嘧啶核合并时想出来的。进一步思索对这样的结构加以修饰，目的是合成类似于这些杂环胺可能的各种互变异构形式的化合物。环状体系并不是非有不可的，事实

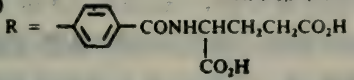
上后来成为一种成功药物——氯胍（proguanil）(5.6) 的化合物就是非环的缩二胍．氯胍是前体药物（prodrug）的一个早期的例子，因为它只有经过代谢转变为环氯胍(5.7*a*) 才有活性，环氯胍是二氢三嗪系列(5.7)的第一个成员．

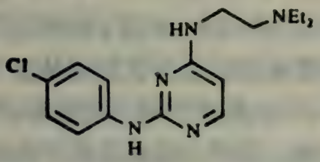


二氢叶酸 (5.1)

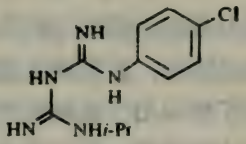


氨甲蝶呤 (5.4)

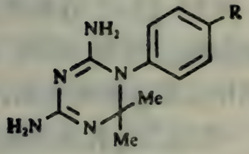




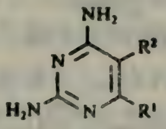
(5.5)



氯胍 (5.6)



二氢三嗪 (5.7)



(5.8)

a R = Cl　　*a* R^1 = Et, R^2 = *p*-ClC_6H_4

b R = OMe　　*b* R^1 = H, R^2 = $(MeO)_3C_6H_2CH_2$

在美国，Burroughs Wellcome 研究组围绕二氨基嘧啶(5.8)作了进一步的化学研究，起初得到息疟定(乙胺嘧啶)(5.8*a*)，后来又得到甲氧苄氨嘧啶（TMP 抗菌增效剂）(5.8*b*)．也是在 40 年代，美国 Cyanamid 公司的科学家循着机理途径找到了新的抗菌剂，目的是设计已知的细菌生长因子，即叶酸的拮抗体，直接得出另外一个二氨基杂环，氨甲蝶呤（MTX）(5.4)．

虽然当时并没有完全认识到，所有上述活性化合物都是通过

抑制二氢叶酸还原酶而起作用的，但20世纪80年代，重点大都正确地放在合理的药物设计上，药物化学家们在评论同行工作时，也用的是这一尺度．同样对于早期研究的评价，也只有充分考虑到当时的局限性才合乎常理．按这些尺度，导致产生二氢叶酸还原酶抑制剂的努力真正是合理药物设计的良好例子．

由于这个酶的普遍性分布，如果不是已观察到对不同化学亚型（subtype）的选择性差异，二氢叶酸还原酶抑制剂的治疗价值将是很有限的．三嗪和嘧啶类抑制剂的某些成员对于来自不同物种的酶表现出显著的特异性．息疟定（*5.8a*）对于来自疟原虫的酶是非常有效的抑制剂，对于来自细菌和哺乳动物的这种酶则效力要小2000—5000倍，因此临床上用于治疟疾． TMP(*5.8b*) 对细菌酶效力最大，对来自疟原虫酶效力大约小14倍，对哺乳动物酶基本上无活性．对细菌二氢叶酸还原酶的选择性抑制是这个药物有效而广泛应用于抗细菌的基础，特别是在协同作用方面，作为磺胺药物的增效剂．磺胺是在另一步，即并入对氨基苯甲酸这一步干扰细菌叶酸合成的一类药物．反之，某些二氢三嗪(*5.7*) 对哺乳动物酶比对细菌酶效力大1000倍．MTX（*5.4*）在体外无选择性，对脊椎动物和细菌的酶几乎同等地抑制． 尽管 MTX 对微生物酶有高的亲合力，但不能在临床上用作抗微生物的药物，因为原生动物和细菌合成它们自己的叶酸，一般缺乏哺乳类细胞所具有的对叶酸及其同族物的吸收体系．因此，叶酸的结构类似物 MTX，不能有效地进入微生物细胞，却能进入哺乳类细胞．它在临床上主要应用是杀伤癌细胞；其理论基础是癌细胞迅速增殖，因此大大地依赖于 DNA 合成，对于 DNA 合成抑制剂的感受性比正常细胞稍大一些．

Hitchings 等曾指出，如果抑制剂是与底物很接近的结构类似物，要达到品种区分，比从更远的化学类别中得来的抑制剂更难些（Hitchings 和 Roth，1980；Hitchings 和 Smith，1980）．

关于二氢叶酸还原酶的全面论述应当包括该酶的作用机理，蛋白质与辅因子、底物或抑制剂的相互作用，还应当论述该酶对不

同抑制剂选择性的品种差异．对这一类酶的研究，以实例显示了现代生物化学、物理有机化学、波谱和X射线结晶技术在阐明酶机理细节中的威力．对于品种间选择性差异的分子基础现在还没有很好地了解．

对于结合在酶上的三个主要类别的抑制剂，每一类已有若干实例用X射线方法作了结构测定．在这些研究中两个是三元络合物，即细菌酶(*L. casei*)-NADPH-氨甲蝶呤(Matthews 等,1978)和鸟类酶-NADPH-二氢三嗪(Volz 等,1982);第三个是二元络合物,细菌酶(*E. coli*)-息疟定(Baker 等，1981)．尽管是不同的酶，三类抑制剂与活性位点的蛋白质残基以惊人的类似方式相互作用．

氨甲蝶呤(*5.4*)以开放的构象结合在一个横切酶一面的深穴中． 蝶呤环几乎与对氨基苯甲酰基的芳环垂直． 氨甲蝶呤与酶之间有17处相互作用,其中10个涉及蝶呤环.Asp-26（*L. casei*）与蝶呤的 N_1 之间的电荷相互作用在结合蝶呤断片上似乎至关重

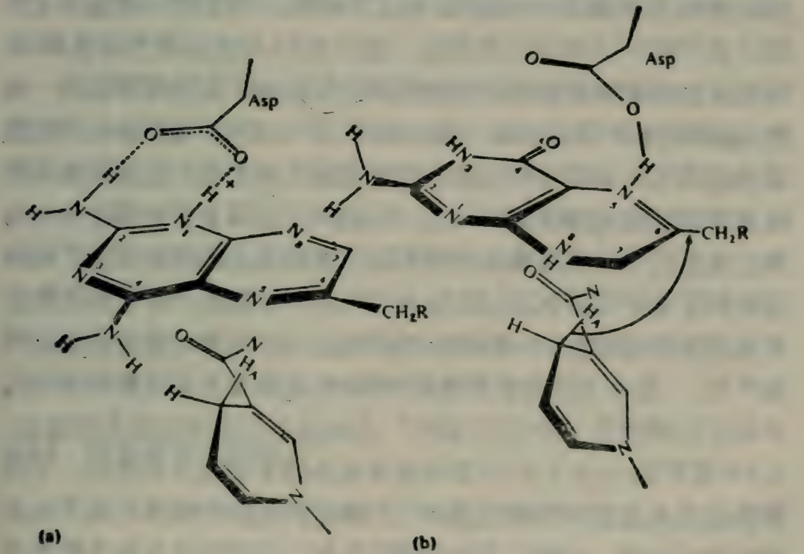


图 5.3　在二氢叶酸还原酶的活性位点中氨甲蝶呤(a)和二氢叶酸(b)的取向

要．二氢三嗪抑制剂结合到鸟类酶上时，三嗪环和甲氧基苯环分别处在与酶-氨甲蝶呤络合物中嘧啶和氨烷基吡嗪断片相应的位置．

在氨甲蝶呤(*5.4*)不是底物而是抑制剂的情况下，NADPH 与氨甲蝶呤的蝶呤环之间的几何关系与氢负离子从还原型烟酰胺环的A侧转移这一实验证据相符[图 5.3(a)]．

在中性 pH 和未结合的状态下，各类抑制剂是未质子化的(未结合的氨甲蝶呤 N_1 $pK_a = 5.73$)，但是在结合状态，$pK_a \geqslant 10$ 时，N_1 处是质子化的 (Volz 等，1982；Cocco 等，1981；Ozaki 等，1981；Roberts 等，1981)。对于 E. coli 酶，电荷相互作用是在甲氧苄氨嘧啶 (TMP) 的 N_1 与 Asp-27 之间，鸟类酶的类似作用是在三嗪的 N_1 与 Glu-30 之间．得到的证据表明，二氢叶酸是非质子化的，无论是在生理 pH 下的自由状态还是结合到酶上．最近 Cocco 等(1981)推论，氨甲蝶呤和二氢叶酸与酶的亲合力相差 1000 倍以上几乎完全是由于结合的氨甲蝶呤中 N_1 的高 pK_a．这扩展了 Baker 较早的提法，氨甲蝶呤的较大亲合力是由于二氨基嘧啶相对于 2-氨基-4-氧嘧啶增大了碱性．人们看一眼就可立即明了氨甲蝶呤(*5.4*)与天然底物二氢叶酸(*5.1*)在结构上的类似，而可能会认为底物和抑制剂结合到活性位点时，如果不是以同一构象，也是以很类似的构象．Matthews 等 (1978) 曾讨论这样的假设中所固有的立体化学内涵，那就是氢负离子从二氢烟酰胺环的 C_4 转移到二氢吡嗪环的 C_6 时，将得到在 C_6 具 *R* 绝对构型的对映体．还提出另一个可供选择但不那么显而易见的结合方式，蝶呤环旋转了 180°，把 N_1 和 N_8 分别与 C_4 和 N_5 交换，N_{10} 上的侧链基本保持不变，这样一种结合方式将得出，在 C_6 具 *S* 绝对构型的四氢叶酸． 迄今还没有关于该酶-底物络合物 X 射线分析的报告，但最近已得到后一种即以“翻转”为结合方式的有说服力的证据．5,10-亚甲基-5,6,7,8-四氢叶酸溴化物的 X 射线分析表明，天然异构体中 C_6 处的绝对构型是 *R*，这相当于四氢叶酸(*5.2*)的 *S* 构型 (Fontecilla 等，1979)；而 6-甲基-7,8-二氢蝶呤用二氢叶酸还原酶还原得出了单一的四氢衍生物，与 (*S*)-丙氨酸关联，表明其中

C_6 处的绝对构型是 *S*(Armarego 等,1980).

已提出的二氢叶酸与酶的生产性结合方式简示于图 5.3(b). 天冬氨酸羧基的联合与现今认为二氢叶酸的结合方式是非质子化的这一想法一致. 很显然,在反应坐标的某一点,有一个质子形式上转移到 N_5,而天冬氨酸可能是质子的来源.

像氨甲蝶呤(*5.4*)和二氢叶酸(*5.1*)这样密切相关的类似物,其不同的结合方式例示了在小的候选药物分子与酶或受体的相互作用中,看起来像是微不足道的结构修饰常常会引起差异. 在这种特定情况下,4-氧代替 4-氨基的细小结构改变既改变结合方式,又引起对活性位点亲合力的大大加强.

前面已经提到,在对三大类抑制剂的亲合力方面,来自不同品种的二氢叶酸还原酶存在差异. 了解这种差异是一个艰巨的挑战. 人们已经知道这些酶在结构上有某些明显的差别.例如,细菌酶的分子量约为 18000,与来源于动物或其它品种细菌的酶表现相对小的顺序同一性.动物还原酶一般含氨基酸比细菌酶约少 30 个,而且是高度同系的. 相比之下,原生动物的酶是巨大的(分子量约 180 000).

从最近的文献看,显然还在继续对设计二氢叶酸还原酶的抑制剂投入巨大的努力. 在这方面,近年来涌现的详细的结构和机理知识将有很大帮助.一项特别有兴趣的研究是由 Burrough-Wellcome 的一些科学家发表的(Kuyper 等,1982). 通过考察X射线研究观察到的活性位点中的相互作用,他们已能设计出效力大为增强的甲氧苄氨嘧啶的类似物. 然而,现今医药上应用的二氢叶酸还原酶抑制剂的不足之处是否足够大,发展按相同机理起作用的新药物需投入多少成本,尚未得到肯定.

5.2.2 非甾体抗炎药物

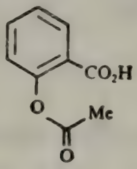
药物化学史中有很多这样寻找药物的例子: 在已发现该药物之后很久才认识到它在分子水平的靶子是一种酶. 在前一节中我们已经知道,设计用作抗代谢物的一些化合物,其抗菌性质最终与

二氢叶酸还原酶的抑制有关．在其它许多领域，药物设计是根据某一种疾病的动物模拟试验，而后才认识到它是依赖于某一特定的酶或生物合成途径．时常是在得到可用的药物之后，才有可能清楚地了解某种特定病态的生物化学机理．一类被称为非甾体抗炎剂（NSAID）的药物的发现就是这种药物设计的很好的例子．

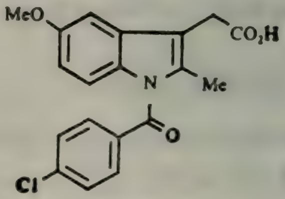
通过对 NSAID 的历史作一简短回顾，可以从药物化学家的思路中得到很有意义的领悟．这类药物是从为了缓解类风湿关节炎的研究规划中涌现出来的．

在本世纪50年代引入强力的抗炎甾体类以前，阿司匹林(*5.9*)被用为抗炎药物已有大约半个世纪．抗炎甾体是高效的药物，但是它们产生激素性和代谢性副作用的倾向严重限制了它们的应用，这些限制激起人们寻找具抗炎活性的新结构．

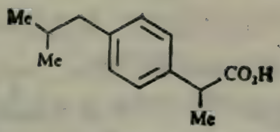
在60年代早期，Merck 公司的化学家们（Shen 和 Winter，1977; Shen, 1981）受到两个观察的启发：第一是血清素(5-羟色胺)的强力抗炎作用，第二是对关节炎患者观察到不正常的色氨酸代谢．我们现在知道，这些因素对于在这个规划中发展出来的一些药物的活性都不重要，但是它们却起到把人们的注意力引向吲哚的作用．这些努力到1961年发现吲哚美辛（indomethacin）(*5.10*)时达到顶点．人们立即对这一药物和很快随之发现的其它许多药物，例如异丁苯丙酸(*5.11*)的作用机理进行了深入研究，但是直到10年之后 Vane（1971）才宣称消炎痛和阿司匹林能抑制前列腺素的生物合成，而有些前列腺素是发炎的重要介体．科学家们很快又收集了证据，将这一体外的观察与这些化合物的体内和临床性质联系起来．



(*5.9*)



(*5.10*)



(5.11)

前列腺素是花生四烯酸(5.12)代谢所产生的一连串产物中的成员(图5.4)．它们的生成受环-加氧酶控制，其最终产物是环状内过氧化物 PGG_2 (5.13)． 虽然有几种哺乳动物的环-加氧酶已被精制到均一状态（Samuelsson 等,1978)，但对这一高度复杂的酶转化作用的多数细节还没有弄清楚．在血红素存在下，该酶催化花生四烯酸(5.12)转化为 PGG_2 (5.13) 的环-加氧酶反应． 此外，在色氨酸存在下，进一步发生 PGG_2 的氢过氧基开裂，生成

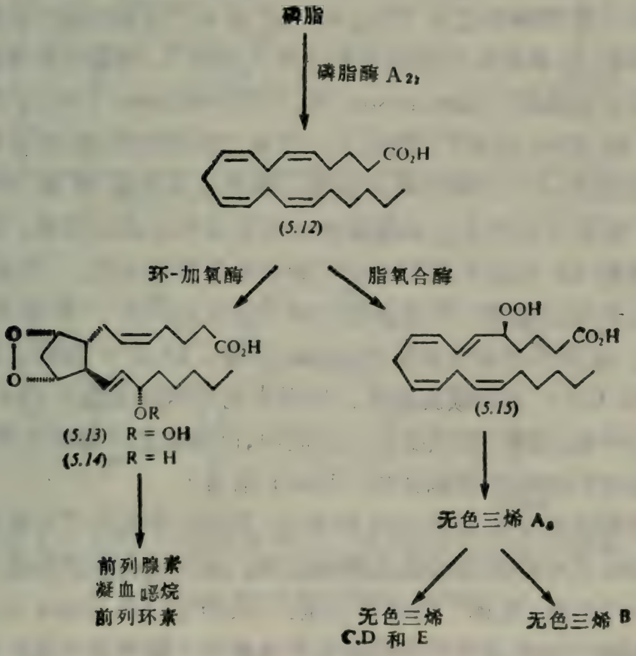


图 5.4 花生四烯酸代谢的两条途径

PGH_2 (*5.14*). 环-加氧酶和过氧物酶活性之比在精制过程中不发生改变，但用精制酶进行的实验表明，阿司匹林和吲哚美辛只抑制环-加氧酶活性而不抑制过氧物酶活性.

在这里回顾一下前面已讨论过的适当酶选择的重要性是适宜的. 环-加氧酶是在 NSAID 之后发现的. 如果酶的选择在寻找药物之前，许多科学家可能会认为环-加氧酶不是阻断花生四烯酸代谢的恰当点. 前列腺素几乎存在于一切组织中，在机体内发挥多种生物功能. 例如，前列腺素和凝血噁烷在凝血和血栓形成所涉及的血小板与血管壁之间相互作用中保持关键性的平衡. 实际上 NSAID的某些副作用可以归因于在发炎以外的生物作用——花生四烯酸代谢物水平的降低中. 值得注意的是，如果存在这些影响，也大都未被发现，因为 NSAID 类仍是现今医学上最广泛应用的药物之一(布洛芬是 1981 年美国第三位最畅销的药物).

花生四烯酸转化为 PGG_2 是一个复杂的过程，但一系列研究已揭示环-加氧酶反应的机理和立体化学细节，能够让科学家推测这一反应的机理 (Samuelsson 等，1978; Walsh, 1981). 其中如 Gund 和 Shen (1977) 提出了一个言之成理的机理(图 5.5). 第一步是假定 Δ^{11}-双键的烯丙基氢过氧化，决定速度是 C-13 上 pro-S 氢原子的移去. 该酶兼有血红素铁和非血红素铁，提示人们联想到 O_2 活化和氢的移去可能都是金属促进的. 中间体氢过氧化物可以逸去，但通常是在同一活性位点进一步氧化生成 PGG_2. 这要求过氧自由基进攻 Δ^8-双键，在 C-9 闭环，同时在 C-8 和 C-12 之间顺旋闭环. 所得出的烯丙自由基在 C-15 加合又一分子氧. 在环-加氧酶催化反应中，已观察到化学发光现象(单线氧衰变?)和电子自旋共振 (ESR) 信号.

在吲哚美辛发现之后的 20 年中，药物化学制成了为数众多的 NSAID，其中多数是芳基乙酸或丙酸. 这些化合物导致或受益于各种 NSAID“受体”的假设模型. 其中之一是 Gund 和 Shen (1977)在药物化学家利用计算机帮助对分子模型进行构象分析的早期努力中提出的. 他们结合了以上所总结的机理知识以及关于

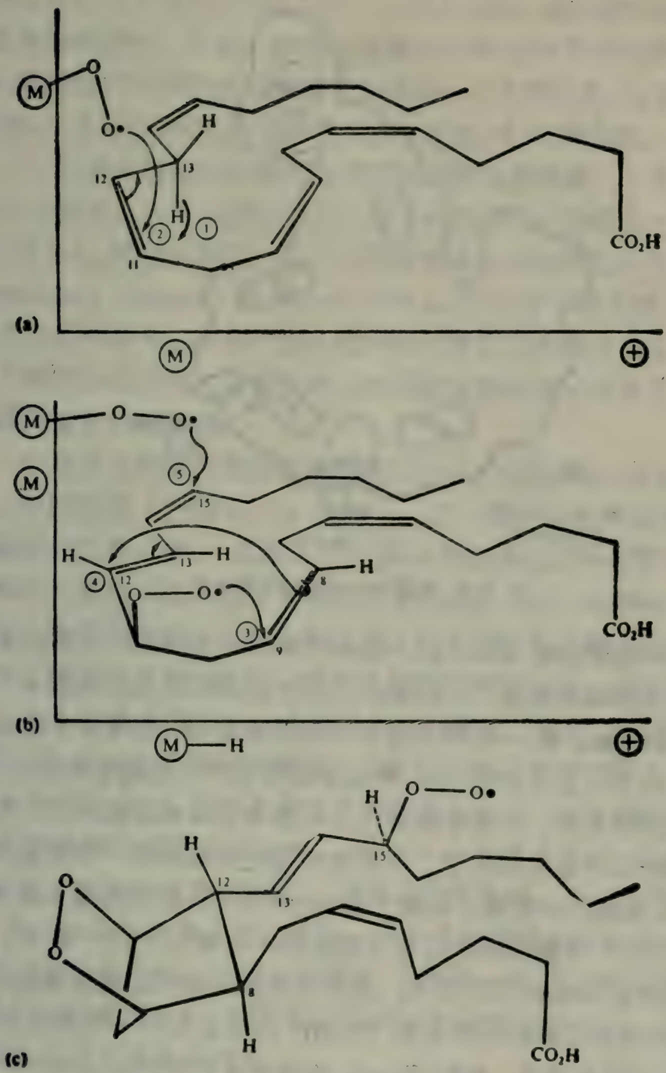


图 5.5 由花生四烯酸生成 PGG_2 的假设机理 (a) 11，12-双键的烯丙基氢过氧化；(b) 烯丙基氢过氧自由基的环化和进一步氧化；(c) 在活性部位 PGG_2 的构象.

一系列 NSAID 和花生四烯酸本身结构上的知识，提出能够符合多数现有结构知识的模型，包括一个平面疏水区域，平面下边有一

图 5.6 假设的环-加氧酶活性位点

个羧酸一结合部位（图 5.6）. 花生四烯酸的 Δ^5 和 Δ^8 双键以及羧基被疏水区域所接受. 此外他们又提出能容纳花生四烯酸 Δ^{11} 和 Δ^{14} 双键的疏水槽,一些氧化性转化在这里发生. 吲哚美辛能与这个模型的活性位点相互作用,吲哚环结合到平面的疏水部位上.苯环被疏水槽容纳，而对位氯取代基可能与金属中心相作用. 形成这类模型设计基础的假设，许多是容易受到挑剔的，特别是对于像环-加氧酶这样的酶，还缺乏结构上的知识,催化机理又特别复杂. NSAID 可能仅结合到花生四烯酸一结合位点的一部分，同时利用未被底物占据的位点. 甚至看来似乎有很好理论根据的假设,例如花生四烯酸的羧基和 NSAID 的羧基在同一位点结合,也可能被证明是错的. 例如 Fisons 的科学家们曾提出,NSAID 类，包括吲哚美辛的羧酸基，模拟 11-氢过氧基团，配位到金属中心 (Appleton 和 Brown, 1979). 他们说这个模型容纳了许多 NSAID 结构,比 Gund-Shen 模型还好些.

像这样的模型,作为结构-活性知识之后的合理化解释是有意

义的；它们也为药物化学家提供一个概念框架，据此设计未来的环-加氧酶抑制剂．但是，特别有兴趣的是环-加氧酶活性位点的模型，因为它们可能还给药物化学家提供一个难得的机会，拿起一个模型，几乎原样不动，把它应用到另一个酶，5-脂氧合酶．

5-脂氧合酶在最近阐明的花生四烯酸代谢的第二个主要途径中位于前列．这个“线型”途径产生了称为无色三烯类的一族代谢物(图 5.4)，现在认识到，它们是气喘和其他过敏反应的重要介体(mediator)(Borgeat 和 Sirois, 1981)．这一途径的某些产物，特别是无色三烯 B_4(LTB$_4$)也可能在前列腺素促进的发炎反应中起到关键的协同作用．抑制无色三烯类的生物合成对消炎治疗可能是同样重要和有益的．

5-脂氧合酶催化花生四烯酸氧化生成5-氢过氧-二十碳-6,8,11,14-四烯酸(5-HPETE)(*5.15*)．这一反应恰好类似于环-加氧酶反应的第一步．虽然关于5-脂氧合酶催化的反应和5-脂氧合酶的活性位点还没有分子层次细节的报道，由环-加氧酶和其它脂氧合酶得到的证据，加上我们对这些反应的电子和立体化学要求的了解*，以及对大自然以经济手段设计酶的信念，使我们构成了一个5-脂氧合酶活性位点的概念性的模型．首先，通过对氚标记的立体专属性花生四烯酸转化为相应的氢过氧酸的研究(Hamberg 和 Hamberg, 1980)确立了有关血小板12-脂氧合酶和大豆15-脂氧合酶的立体化学细节．图5.7(a)描述了在12-脂氧合酶途径中一些立体化学的发现．不仅是脂氧合酶，也包括环-加氧酶，在上述烯丙基氢过氧化的第一步中都遵循图5.7(b)所示的一般性立体化学途径．脂氧合酶同环-加氧酶一样，是含铁的酶．这一系列证据提示我们，但不是证明，包括5-脂氧合酶在内，所有这些酶的氧化机理是类似的．

这个假设使我们能构成一条协同的和铁介导的5-脂氧合酶反应的假设途径[图5.7(c)](不一定是成对电子过程)．为了适当

---

* 见酶催化中的立体化学效应(第二章)．

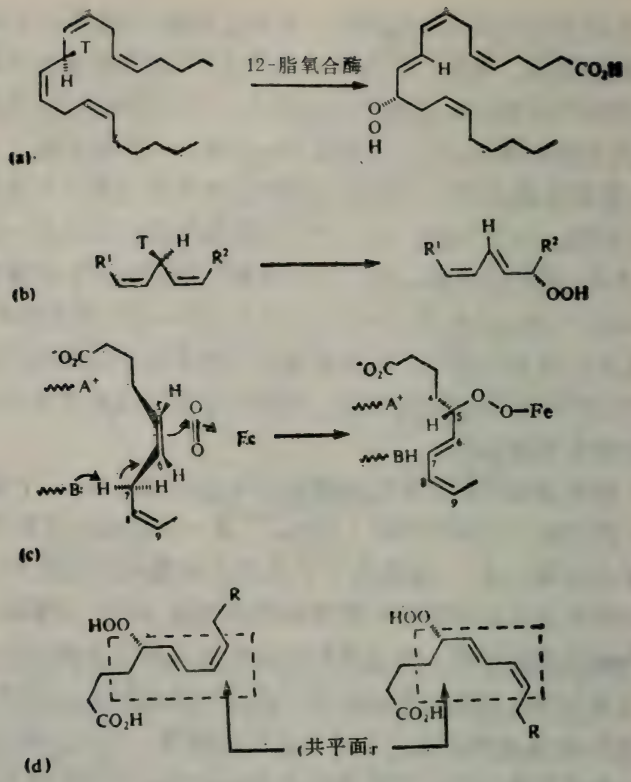


图 5.7 (a) 12-脂氧合酶反应的立体化学推论; (b) 一般性的脂氧合酶反应的立体化学途径; (c) 花生四烯酸被 5-脂氧合酶转化为 5-HPETE 的假设机理; (d) 在 5-脂氧合酶的活性位点中 5-HPETE 的假设构象.

的轨道重叠, 要求 4, 5,6,7 和 8 等原子共平面. 为了进一步削弱 C_7—H 键, 5—6 和 8—9 原子间的双键也很可能处在同一平面上. 这些要求放在一起, 给我们提供了 5-脂氧合酶活性位点中产物 5-HPETE 的两个假设构象[图 5.7(d)].

在缺乏详细机理研究的情况下, 能从一个酶促反应中得到这样详细的结构知识是罕见的. 这种 5-脂氧合酶活性位点模型和底物花生四烯酸的构象限制了可作为合理设计 5-脂氧合酶抑制剂

的基础.从以上讨论过的环-氧合酶活性位点的模型,平面的 π-电子体系、羧基结合位点到能与适当选择和安置的配体牢固结合的铁中心等等，都已是熟悉的了. 对药物化学家的挑战是把这些分子细节装配在一起,并且利用环-氧合酶模型中对抑制剂活性的成功理解来设计强力而有选择性的 5-脂氧合酶抑制剂.

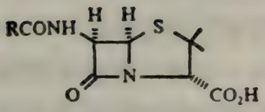
环-氧合酶的发现远在已证明一些药物有疗效之后. 另一方面,在脂氧合酶方面,在开始寻找药物之前药物化学家的靶酶已被鉴定. 时间将说明,在寻找药物的时候就已对分子靶垜有所认识,那么任务是会容易一些.

5.2.3 β-内酰胺抗菌素

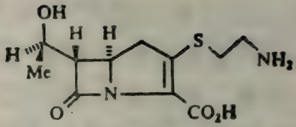
Fleming 发现青霉素和第二次世界大战早期 Florey 及其同工作者使青霉素得到医学上实际应用的先驱工作，是科学界多数同行所熟悉的故事. 到现在 β-内酰胺类仍然是抗菌剂中最重要的类别,而且仍旧是药物化学家注意的焦点之一（关于 β-内酰胺生物合成的讨论见第七章). 在制药工业的历史中，没有其它哪一类药物曾经是研究得如此充分的对象. 难得有一年没有重大的新发现,打破关于抗菌活性结构上先决条件的早期观点,例如，比较青霉素 G(*5.16*) 与两种较新的抗菌素塞吩霉素 (thienamycin, *5.18*) 和被称为 monobactam 的单环 β-内酰胺，SQ26455(*5.19*) 的结构.

β-内酰胺类通过破坏细菌细胞壁的合成而杀菌，特别是在生物合成系列的最后几步中抑制使肽聚糖链交联的转肽酶(图 5.8),该酶形式上在一个肽聚糖链的末端断开一个 D-丙氨酰基-D-丙氨酸键,同时在留下的 D-丙氨酸同第二个肽聚糖链的五甘氨酸序列的末端甘氨酸之间形成一个新的酰胺键 (Tipper, 1979; Tomasz, 1979).

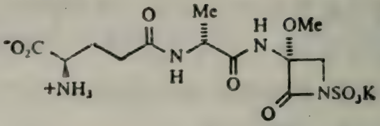
Tipper 和 Strominger 首先提出,青霉素是被转肽酶断裂的 D-丙氨酰-D-丙氨酸部分的底物类似物(图 5.9). 更近期一些,青霉素是一个过渡态类似物的提法已受到很大注意(见 2.8 节). 正



(5.16) R = $PhCH_2$
(5.17) R = $PhOCH_2$



(5.18)



(5.19)

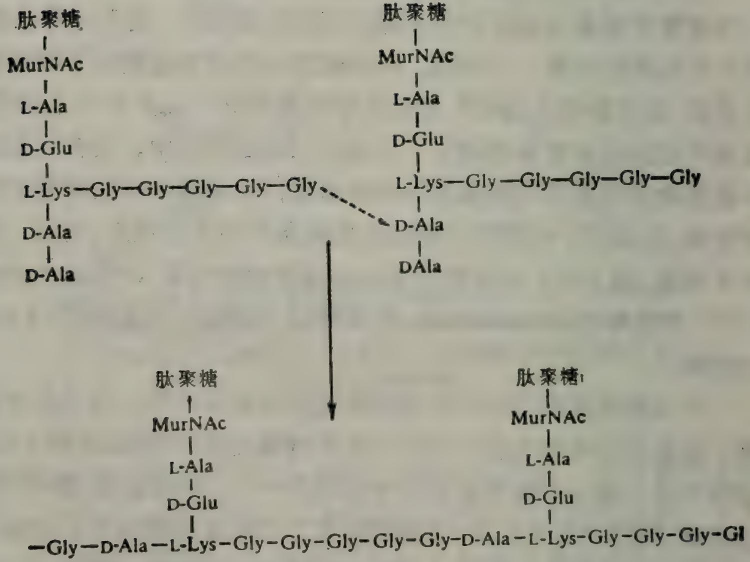


图 5.8 在细菌细胞壁合成中两个线型肽聚糖链的转肽作用

在争议的是，β-内酰胺的酰胺键中缺乏有效的共轭，是否在反应坐标的某一点上底物也有相同情况。

早期的青霉素明显地存在许多严重缺点；口服时几乎没有活

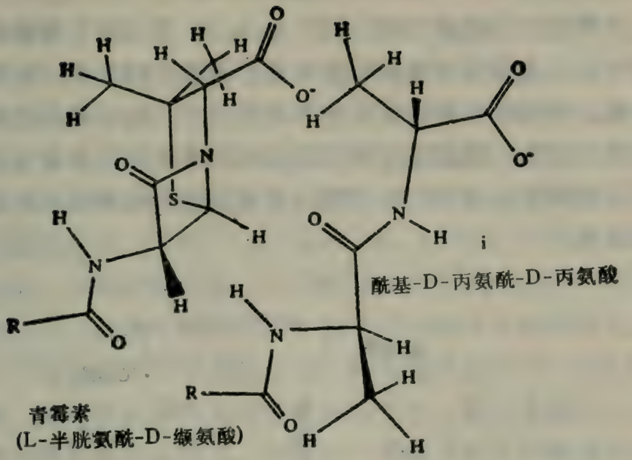


图 5.9 青霉素与细菌细胞壁的酰基-D-丙氨酰-D-丙氨酸断片在结构上的类似性

性;抗菌谱很有限;特别是对革兰氏阴性菌,由于它们迅速地经肾排泄,在生物体内的半衰期很短;还有它们容易在细菌的 β-内酰胺酶作用下失活;该酶能使抗菌素的 β-内酰胺开环. 这些缺点的大部分已被较新的抗菌剂克服,连同优良的安全限度,成为这类抗菌素商业上取得成功的基础. 然而,寻求更新和改良这类药剂的努力仍持续不衰,重点放在进一步扩展活性方面,并且改善抗菌素对 β-内酰胺酶作用的稳定性. 考虑到 β-内酰胺酶的复杂多样以及整个细菌类中借质粒传播的基因迅速传递的倾向,后者更是关系重大. 或许抗药性最吸引人和最富有挑战性的地方是那些使抗菌素失活的酶与本身就是药物抑制作用的靶酶之间真实的或是表观的类似性.

用放射性标记 β-内酰胺进行的研究已经证明,青霉素与细菌细胞质膜中一种或多种能结合青霉素的蛋白质(PBP)相结合. 已鉴定出七种蛋白质,按分子量递减的次序编号为 I_a, I_b, II, III, IV, V 和 VI. 这些 PBP 是一些转肽酶和羧肽酶的混合物, 以后者为主, 羧肽酶和转肽酶的差别在于作为肽聚糖中倒数第二个 D-丙

氨酰基部分受体的亲核物质不同，对前者受体是水，而对后者则是另一肽聚糖的甘氨酸末端. PBP I_a, I_b, II 和 III 是转肽酶，它们中的一些或者全部对细胞的生存是必需的. PBP IV, V 和 VI 是羧肽酶，对细菌细胞的生长并非必不可少. 由于取得转肽酶有巨大的技术困难，我们关于青霉素抑制机理的知识多数来自用羧肽酶所作的研究： 假定 β-内酰胺类抑制转肽酶和羧肽酶是按很类似的机理.

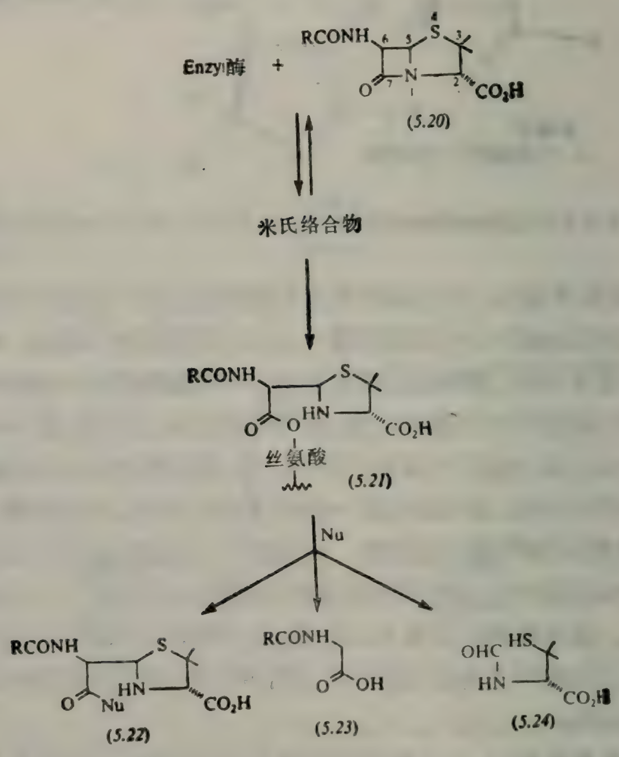


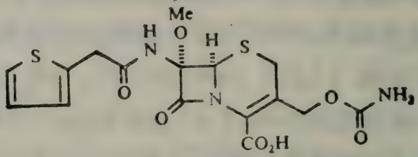
图 5.10 青霉素与细菌的 β-内酰胺酶和羧肽酶的相互作用： 酰基-酶络合物可采取的分解途径，Nu = 水、氨基酸、醇

有证据暗示，青霉素按同样的方式与内酰胺酶和羧肽酶相互作用(图 5.10). 继开始形成米凯利斯络合物之后，又形成另一个

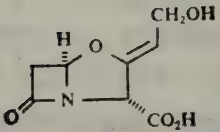
络合物(*5.21*)，其中青霉素通过活性部位中一个丝氨酸残基的酰化以共价键结合到酶上（Yocum 等，1982；Knowles，1982）。至于内酰胺酶，是通过青霉酰基转移到水分子上，同时生成青霉噻唑酸(*5.22*)(Nu═OH) 而使酶再生。而对青霉素敏感的酶，其水解再生通常与青霉素 5，6-键的断裂生成酰化甘氨酸(*5.23*)和 *N*-甲酰青霉胺(*5.24*)同时发生；尽管当受体是胺或醇时会得到青霉噻唑酸衍生物(*5.22*)(Marquet 等，1979)，但不发生酶的不可逆失活。没有迹象表明 5,6-键断裂的产物来自不同于酰基-酶络合物(*5.21*)的酶结合中间体。裂片反应似乎是由再活化过程产生的，可能遵循与正常底物反应中释放酶结合的 D-丙氨酸有关的机理。酰化络合物的生成速度和稳定性，就某类酶而言，可能决定对内酰胺酶的抵抗力，而对另一类酶而言又可能决定抗菌活性。对于青霉素敏感酶，青霉噻唑酰化酶的分解速度可能非常慢；例如从 Streptomycete R39 得来的苄基青霉素-羧肽酶络合物，在生理条件下，半衰期是 4250 分钟（Frere 等，1975）。较新的抗内酰胺酶的抗菌素之所以能抗该酶，是因为它们是内酰胺酶很差的底物，但仍保留对青霉素敏感酶的抑制性。比如，头孢噻吩(*5.25*)被大肠杆菌的内酰胺酶水解比青霉素 V(5.16)的水解慢 10^5 倍，后者是较老的青霉素之一（Fisher 等，1980）。

70 年代早期，Beecham 药厂的工作人员从 Streptomyces clavuligerus 分离出棒曲霉酸（clavulanic acid)(*5.26*)开始了 *β*-内酰胺历史的一个新篇章（Brown，1981）。棒曲霉酸不同于在此之前研究过的所有 *β*-内酰胺，它只是一种弱的抗菌剂，但却是 *β*-内酰胺酶的抑制剂和不可逆去活剂。棒曲霉酸与对内酰胺酶敏感的青霉素的混合物一起能发挥很好的协同抗菌效果。实际上，现在欧州市场上已有这种合剂出售。棒曲霉酸的发现刺激了从天然来源或由人工合成寻找其它抑制剂的研究。因此，近年来已涌现出了大批这样的化合物，包括半合成的青霉烷酸砜(*5.27*)，6-*β*-溴青霉烷酸(*5.28*)，和一些天然存在的碳青霉内酰胺（carbapenem）例如 MM13902(*5.29*)和噻嗯霉素(*5.18*)。碳青霉内酰胺类与其它

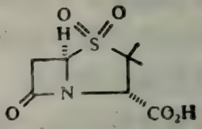
几个不同，它们还是良好的广谱抗菌剂． 对于各类 β-内酰胺酶抑制剂，被抑制的物种是初始酰基-酶络合物的一个或多个转变产物，而不是酰基-酶络合物本身．这与青霉素类抑制转肽酶和羧肽酶的机理恰好相反．



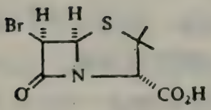
(5.25)



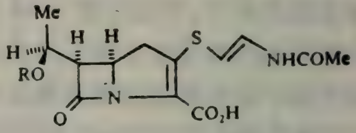
(5.26)



(5.27)



(5.28)



(5.29) R = SO_3H

(5.30) R = H

这些化合物抑制内酰胺酶的复杂机理在细节上是不相同的．Knowles (1982) 曾把不同机理作了归纳，如图 5.11 所示．每一抑制剂都可以通过正常的途径周转，产生由酰基——酶中间体 (5.33) 衍生出来的产物．这些产物也时常与五员杂环的开裂有关．

在砜类和棒曲霉酸中一个电子低位槽 X 的存在，使四面体中间体或酰基-酶络合物的一部分转岔到产物得到保证(5.34)，它又能进一步裂成断片，或者更有趣地，俘获酶上一个亲核部位，而使酶不可逆地失活． 对于青霉烷酸砜大约需要 7000 次周转后酶才会失活．较差底物的砜类似物只需较少的周转就能使酶失活．

对于那些对内酰胺酶具有抑制作用的碳青霉内酰胺，似乎有

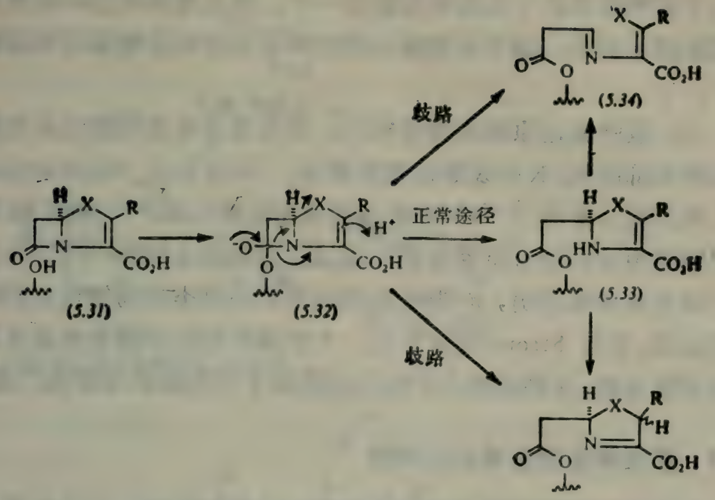


图 5.11 可能导致 β-内酰胺酶的抑制或失活的歧路

不导致不可逆失活的另一条歧路 (Easton 和 Knowles, 1982).在这种情况下,有抑制作用的种类是 Δ′-二氢吡咯(*5.35*),一种从酶释放出来比普通酰基-酶络合物(5.33)慢得多的中间体.

在同一化学系列中,细小的结构修饰都会显著影响采取歧路的程度.这在 MM 22382 (*5.30*) 和它的硫酸酯 MM 13902(*5.29*)的情况可能最为明显.前者迅速被内酰胺酶水解,不发生可被觉察的歧路的参与;而后者是很好的抑制剂.

β-内酰胺系列包括的化合物中,有些既是转肽酶的良好抑制剂同时又是内酰胺酶的良好底物(如青霉素 G);有些是转肽酶的良好抑制剂但是内酰胺酶的不良底物(如头孢噻吩),有些既是转肽酶又是内酰胺酶的良好抑制剂(如 MM 13902),最后,有些是转肽酶的很差的抑制剂,却是内酰胺酶的不可逆自杀式去活剂(如棒曲霉酸).值得注意的是,没有既是转肽酶的良好抑制剂同时又能使内酰胺酶不可逆失活的化合物.

我们还远没有完全了解 β-内酰胺抗菌素结构-活性关系这一具突出重要性的问题.可能是由于缺乏这种了解,以致于每次推

翻关于这种关系的早先见解而前进一步，都是直接来自从自然界发现新的化合物，而不是把酶机理的知识循序渐进地运用到药物设计。

与二氢叶酸还原酶的情况相反，对青霉素敏感的酶以及它们的底物和抑制剂，X射线数据都很稀少。 不过，从 Streptomyces R61 得出的一种对 β-内酰胺敏感的双功能羧肽酶——转肽酶的初步数据中我们会对将要得到的知识有所领略（Kelly 等，1982）。这一研究清楚地表明，β-内酰胺抑制剂和底物类似物结合到酶的相同区域，符合 Strominger 假说。 X射线数据的详细分析是人们所热切期待的，并将增加人们对β-内酰胺了解的新的深度和广度。

5.2.4 胆固醇生物合成的抑制剂

β-内酰胺抗菌素类是考查天然产物的优秀范例，它为化学上寻找有价值的药物提供了一个重要的源泉。在许多其它的疾病领域，科学家们在寻找药物时也依赖天然产物作为结构模式的丰富来源。由于孤立的酶测定法有高灵敏度和专一性，特别适于筛选粗萃取液或未分级的发酵汁。每一萃取液或发酵汁中的几十种天然产物可以在一次测定中进行活性筛选，分离和结构测定等艰巨的工作可以留待生物活性水平证明值得付出更多的努力时再去做。这种发掘药物的办法已经成功地应用到寻找胆固醇生物合成抑制剂上。

血清胆固醇的增高是动脉硬化和冠心病发展的一个主要危险因素。这种病是在西方国家引起死亡的主要原因。整个人体内胆固醇至少有 50% 来自重新合成。因此，抑制胆固醇的生物合成是制药工业上一个很有吸引力的目标。

但是，阻碍这一主要代谢途径是布满潜在陷阱的。胆固醇、泛醌类、多萜醇和异戊烯基腺苷（转移 RNA 的组分之一）等都是这条共同途径的关键产物（图 5.12）（Schroepfer，1981，1982）。胆固醇本身起到合成甾体激素，包括雌激素、睾酮、孕酮等的底物的作用。 这些代谢物保持着生物体内的自我平衡（homoestasis）。对

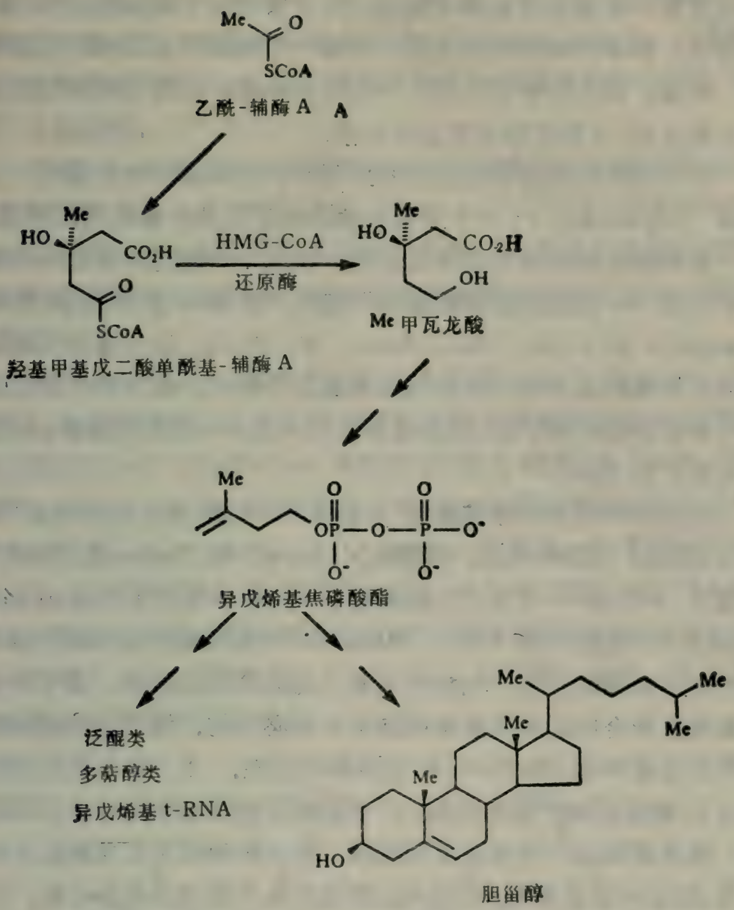
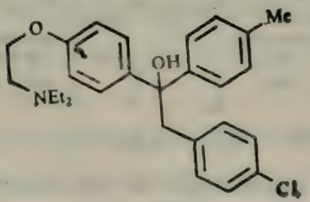


图 5.12 哺乳动物细胞内的甲瓦龙酸代谢

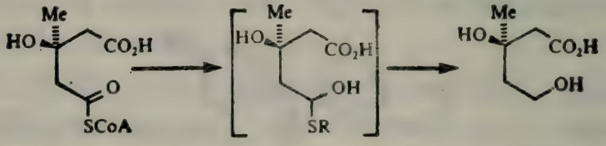


(5.36)

干扰这样一条基础的生物合成途径是否值得寄予期望还是问题．假定这一根本的缺陷能被克服，对哪一个酶步骤加以抑制也需慎重．然而，只有评价了人体内一些特定步骤的抑制剂的有用性和安全性之后，才能正面评定这些问题．

对于某些胆固醇生物合成的抑制剂，临床评价已有报道．三拟醇（triparanol）（*5.36*）对合成途径很后面的步骤起抑制作用．这一药物曾经被推出在临床上应用，但由于可能与一种生物合成的中间体 24-脱氢胆固醇的蓄积引起的严重毒性有关而被撤销(Laughlin 和 Carey, 1962; Tobert 等, 1982)．这类毒性问题说明被抑制酶的适当选择需要慎重考虑，并要把注意力集中到代谢途径中靠前得多的步骤，在那里中间体不像 24-脱氢胆固醇，能有其它的代谢选择．

该途径中的主要限速酶是 3-羟基-3-甲基-戊二酸单酰基-辅酶A还原酶（HMG-CoA 还原酶）(Brown 和 Rodwell, 1980)，它催化 3-羟基-3-甲基戊二酸单酰基-辅酶 A(*5.37*）还原为甲瓦龙酸(*5.39*)的反应(图 5.13)．HMG-CoA 还原酶在调节生物合成途径中有独特的作用．例如在培养人的成纤维细胞时，由培养基来源或重新合成的胆固醇是细胞生长所必需的．培养基中胆固醇的存在显著降低 HMG-CoA 还原酶的活性．用一种不能利用的甾体 7-氧胆甾醇代替胆固醇，严重阻滞细胞生长和降低还原酶活性，推测是通过一种虚假反馈机理．把胆固醇或甲瓦龙酸加入培养基，能逆转生长抑制，但加入乙酸或羟基甲基戊二酸却不能．这



(*5.37*) (*5.38*) (*5.39*)

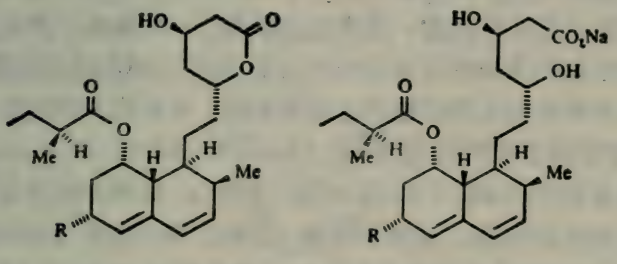
2 NADPH ——→ 2 NADP⁺

图 5.13 HMG-CoA 还原酶催化的两步还原作用

些实验清楚地说明，HMG-CoA 还原酶是这些细胞中胆固醇合成反馈调节的位点。在整体动物中所做的类似实验也表明，在多数生理条件下 HMG-CoA 还原酶是生物体内胆固醇生物合成中被调节关键的酶。

HMG-CoA 还原酶在胆固醇合成中的调节作用以及在常见的高胆固醇症中这一调节明显失效（Brown 等，1981），是多年来把制药工业的注意力引向这个酶的两个因素，但是总是在耽心抑制该途径潜在的灾难性后果，妨碍了药物化学家们全力以赴地研究这个酶。

1976 年，Sankyo 的科学家们宣布发现 ML-236B (*5.40*)，这些耽心才基本消除，这是在筛选天然产物寻找甾体生物合成抑制剂时得到的一个 HMG-CoA 还原酶的强力抑制剂（Endo 等，1976）。ML-236B 的二羟基酸衍生物(*5.42*)是该酶的选择性和竞争性抑制剂，$K_i = 1 \text{nmol} \cdot L^{-1}$。Sankyo 和其他一些实验室的研究表明，它对胆甾醇合成，更重要的是，对几个动物品种血清胆固醇水平有显著效应。没有观察到它有明显的毒性（Endo，1981）。这一发现大大增强了对抑制 HMG-CoA 还原酶的注意，并且为发现其它抑制剂铺平了道路。



(*5.40*) R = H
(*5.41*) R = Me
(*5.42*) R = H
(*5.43*) R = Me

现在已报道至少六个紧密相关的天然产物是 HMG-CoA 还原酶的抑制剂。其中最重要的是甲基衍生物 (*5.41*)，几乎由两处的科学家同时报道，Merck 的科学家称之为 mevinolin（Alberts

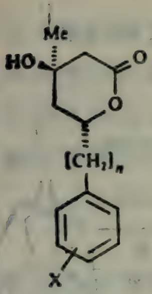
等，1980)，东京农科大学的科学家称之为 monacolin K（Endo, 1979). Mevinolin 的二羟基酸衍生物(*5.43*)是迄今已报道的最强的 HMG-CoA 还原酶抑制剂（K_i = 0.6nmol · L^{-1}).

ML-236B 和 mevinolin 的二羟基酸部分与 HMG-CoA(*5.37*)和甲瓦龙酸（*5.39*）结构上的类似无疑是这些天然产物被 HMG-CoA 还原酶识别的原因. 特别有趣的是，审视和思考它们与假设的酶-结合中间体(*5.38*)的关系. 不同天然产物的相对活性表明，六氢萘和它附带的官能团在结合时有重要而尚未明确的作用.

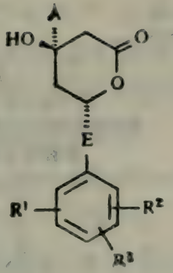
除在图 5.13 所传达的信息之外，对 HMG-CoA 还原酶没有阐明什么结构或机理上的细节. 从几种来源，包括鼠肝得到的酶已被精制到均匀状态（Kleinsek 等,1981)，精制酶所催化的还原反应是一个两步过程，其中两个氢负离子都来自 NADPH. 在第一步还原之后，据信 $NADP^+$ 被释放下来，再结合第二分子的 NADPH，但是哺乳动物的这种酶不释放第一步还原的产物 3-羟基-3-甲基戊醛酸（mevaldic acid). 有些工作者认为，过程的第一步是活性位点上一个半胱氨酸残基接受 3-羟基-3-甲基戊二酸.

尽管还很不完善，这一机理上的信息还是应当作为据以设计潜在抑制剂的框架. 化学家如果忽视 ML-236B 和有关物质所表现的结构上的重要线索，就未免太疏忽了. 要确切了解在制药工业上化学家们采取的方法还为时过早. 科学文献和专利文献指出，早期努力是针对天然产物的合成类似物，具有代表性的如 Sankyo 化学家报道的内酯类(*5.44*)（Sato 等，1980)，和 Merck 科学家取得专利的(*5.45*)（Willard 等，1982). 天然产物本身的结构修饰物也已有报道. 例如以结构（*5.46*）为代表的 mevinolin 中 2-甲基-丁酯部分各种取代物已经出现在专利文献中（Willard, 1981).

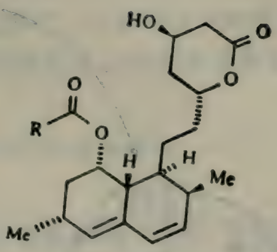
HMG-CoA 还原酶抑制剂对降低血清胆固醇的效用和安全性只能在临床中加以评定. 已证明 ML-236B（*5.40*）(Endo, 1981) 和 mevinolin（*5.41*）(Tobert 等，1982) 能降低正常人的血清胆



(5.44)



(5.45)



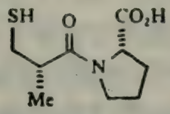
(5.46)

固醇．例如，用 mevinolin 处理 7 天(15mg，每天两次)，血清胆固醇水平下降 25%．如果说在 HMG-CoA 还原酶这一层次阻断胆固醇生物合成途径可能伴有毒性问题，也没有观察到急性中毒的情况．

这种抑制是否是防治动脉硬化和心脏病的有力疗法还有待于进一步临床试验．

5.2.5 血管紧张肽原酶——血管紧张肽体系的抑制剂

从本章前面几节可看出，许多重要药物通过对酶的抑制发挥疗效．它们当中每一个的发展都对找到合理药物这个词赋予不同的含义，但在这方面没有哪一个比得上甲巯丙脯酸（captopril）(5.47)，因为它是第一个应用对酶机理的了解来进行药物设计，从而到得第一个临床上可用的药物．



(5.47)

在血压正常时，血压是由几种复杂机制控制着的．在其中的一种机制，血管紧张肽原酶-血管紧张肽体系中(图 5.14)，两种蛋白酶，血管紧张肽原酶（renin）和血管紧张肽-转化酶（ACE）起着至关重要的作用（Peach，1977；Laragh，1978）．这些酶依次

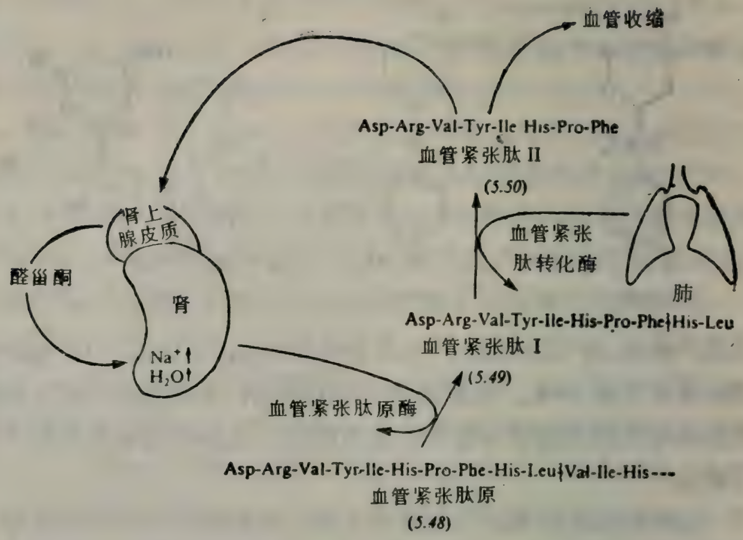


图 5.14 血管紧张肽原酶-血管紧张肽体系

作用，把循环中的血清球蛋白的血管紧张肽原（angiotensinogen）(5.48)经由十肽的血管紧张肽 I (5.49)转变为八肽的血管紧张肽 II (5.50). 按对血压的直接效应来说，血管紧张肽 I 是没有生物活性的，而血管紧张肽 II 是已知最强力的内源性升压物质. 它升高血压至少有两个机理：第一，对血管有直接的收缩效应；第二，刺激肾上腺皮质释放醛甾酮，后者作用于肾，引起钠增加和液体潴留.

高血压指的是单一的参量——血压，但实际上是不同病原的多种疾病的集合，而不是单一的统一体. 因此不大可能有单一的以机理为根据的疗法对所有患者都有效. Squibb 医学研究所的科学家们曾认为，血管紧张肽原酶——血管紧张肽体系的缺陷可能是一小类高血压病的基础，这类高血压病伴有血管紧张肽原酶水平的升高，对这类患者，ACE 的抑制剂能够降低血压（Ondetti 等，1977；Cushman 等，1977）. 作这一推论的不单是 Squibb 的研究者，但他们的竞争者多数放弃了这个想法，认为最可能受益的小

部分患者难以确定，又为数太少，不能保证商业上的成功．像有时大胆的研究项目理所当然会发生的情况那样，比最初设想的要多得多的患者响应这一疗法，虽然下结论为时尚早，但血管紧张肽-转化酶似乎是药物设计的优良靶垛．

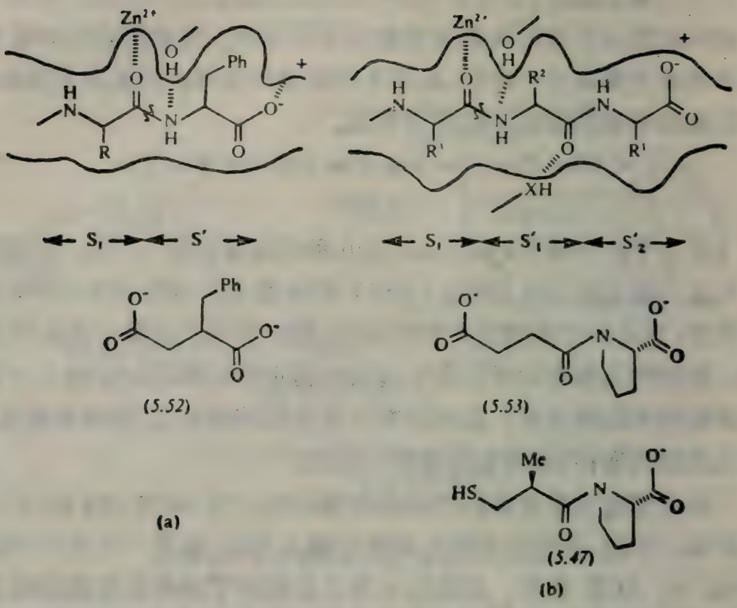
< Glu-Trp-Pro-Arg-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro

(*5.51*)

在这个研究项目的早期，发现几种蛇毒能抑制 ACE，已证明其中之一的九肽 SQ 20881 (*5.51*) 能降低人的血压．SQ 20881 口服无效，不是治疗高血压的实用药物，但它证明了这种办法是可行的．面临的是药物化学中似乎越来越常见的问题——找到小分子代替相对大的肽分子；后者具有所要求的药理效应，但吸收很差，能迅速被代谢掉，或者兼有这两个缺点．

除了知道它是含锌的二肽端解酶以外，对 ACE 我们几乎一无所知．不过，推想它可能与胰羧肽酶 A 类似，也是一个含锌的蛋白酶．与 ACE 相反，羧肽酶 A 是已被较好了解的金属蛋白酶之一 (Quiocho 和Lipscomb, 1971)．它是一个肽链端解酶，能选择性地从底物的 *C*-端断裂一个芳香氨基酸． 活性位点包含一个为了结合羧酸阴离子的阳离子结合位点，一个容纳芳香氨基酸的亲脂裂隙，一个使离去的氨基酸 N-端质子化的质子给体，和一个活化酰胺羰基进行水解的锌阳离子[图 5.15(a)]．

在一阵漫长的收获很小的随机筛选之后，Byers 和 Wolfenden (1973) 报道，L-苄基丁二酸 (*5.52*) 是羧肽酶 A 的一个强力竞争性抑制剂，这启发人们进行非常重要的突破．同 Byers 和 Wolfenden 一样， Squibb 的科学家们推论这个抑制剂与活性部位的结合和羧肽酶 A 与所催化反应的底物及产物的结合很有共同之处．由于 ACE 从血管紧张肽 I 断裂下 *C*-端的二肽，而羧肽酶 A 从它的底物 *C*-端断裂下单一的氨基酸，他们进一步认为，丁二酰基氨基酸而不是苄基丁二酸，将是设计 ACE 抑制剂更合适的出发点．脯氨酸被选作目标抑制剂的末端氨基酸，因为它是一切天然存在的肽类抑制剂[例如(*5.51*)] 的末端氨基酸．



(5.52) (5.53) (a) (5.47) (b)

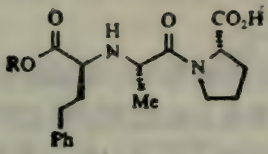
图 5.15 金属蛋白酶活性部位中的底物和抑制剂

(a) 羧肽酶 A；(b) 血管紧张肽-转化酶.

合成的第一个化合物丁二酰基脯氨酸(*5.53*) 是一个弱竞争性 ACE 抑制剂. 随后人们作了许多小的结构改变，其中最重要的是用巯基代替丁二酰脯氨酸中的羧酸阴离子. 从这些研究中很快发现的药物是甲巯丙脯酸 (*5.47*)，$K_i = 1.7 \times 10^{-9} mol \cdot L^{-1}$，它不仅是同首先引入临床的九肽(*5.51*) 同样强的 ACE 抑制剂，而且口服有效.

甲巯丙脯酸在 1981 年由美国管理当局批准，在高血压治疗上占有适当位置. 但是它的应用有时伴有副作用(血液疾病、味觉障碍、皮疹)，妨碍了它在治高血压药物中占主导地位.

其他许多药物公司极力追循这一研究路线. 最近有 ACE 抑制剂结构-活性关系的详细综述 (Petrillo 和 Ondetti, 1982). 至少有一个'第二代'抑制剂，enalopril (*5.54*)，一种母体酸(5.55)的前体药物，现正在临床评价中 (Petchett 等, 1980). Enalopril 的



(5.54) R = Et
(5.55) R = H

发明者曾提出，它是一个过渡态类似物，但似乎也说得通的是，它是一个双产物抑制剂，即它综合了存在于酶反应的两个产物中的一些结合特点．有趣的是，几个新抑制剂在能与酶的 S_1 亚位点(subsite)相结合的位置上都含有一个芳香残基．

这一激动人心的治疗高血压的新方法的未来，主要取决于对第二代 ACE 抑制剂的临床观察．甲巯丙脯酸产生的副作用为这一药物所特有，还是更普遍地与以这种机理起作用的药剂有联系？不论对这一问题的答案如何，对 ACE 抑制剂作为减弱血管紧张肽 II 所促成的升压效应的药物也算有了一个显而易见的替代．血管紧张肽原酶的抑制剂在阻滞血管紧张肽 II 的合成上，应当同 ACE 抑制剂一样有效．附带提一下，用血管紧张肽原酶抑制剂进行的研究应当增加我们对 ACE 抑制剂降低血压的机理的了解，因为 ACE 催化舒缓激肽(bradykinin)以及血管紧张肽 I 的水解，而血管紧张肽原酶则对舒缓激肽没有作用．舒缓激肽是一种强的血管扩张剂，因此 ACE 抑制剂可以通过两种机理影响血管的状况，减少血管紧张肽 II 的合成和降低舒缓激肽的分解．现今的观点倾向于把前者作为甲巯丙脯酸降低血压的主要机理．

像我们将看到的，寻找血管紧张肽原酶的抑制剂所面临的挑战与 10 年前 Squibb 科学家们面临的挑战十分相像．血管紧张肽原酶是酸类或天冬氨酰基类蛋白酶的一员 (Tang, 1977)．这类成员包括哺乳动物胃肠酶的胃蛋白酶，和几种来源于真菌例如 *Pencillium janthinellum* 和 *Rhizopus chinesis* 的酶．

酸蛋白酶在两个疏水氨基酸之间断裂肽链，对于人类血管紧张肽原酶易感受的环节是，在血管紧张肽原的亮氨酸与缬氨酸两

残基之间．催化机理经常涉及活性位点上两个天冬氨酰基羧基的参与．

寻找具治疗价值的血管紧张肽原酶抑制剂有许多的实际困难．这些都起因于灵长类与啮齿类动物的底物和酶都有差别．虽然如此，最近 Cody 与同工作者(1980)发现十肽(*5.56*)在体外能抑制血管紧张肽原酶，并防止猴子因注入人类血管紧张肽原酶而引起的升压反应，这清楚地表明以上疗法是可行的．它与Squibb的九肽(*5.51*)相类似是明显的．

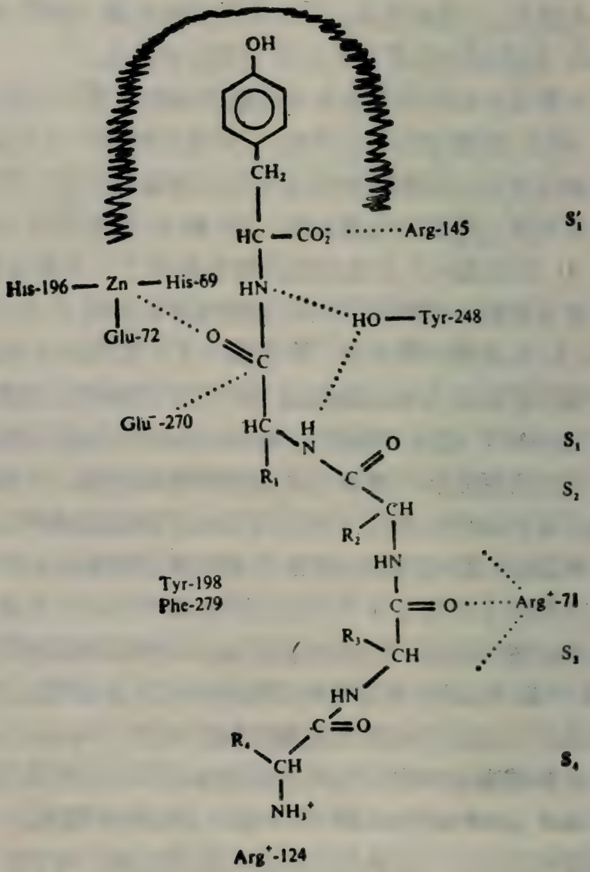


图 5.16 羧肽酶 A: 活性部位中各种相互作用的细节

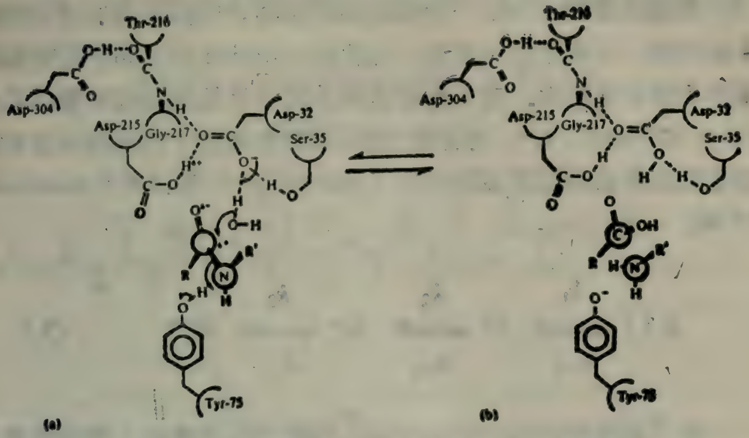


图 5.17 对酸性蛋白酶、青霉蛋白酶提出的催化机理

与 ACE 的情况相同，一些技术性困难妨碍了对血管紧张肽原酶详细结构的研究，而注意力集中到酸蛋白酶的其它成员，特别是真菌酶：青霉胃蛋白酶，已得到它 0.28nm（2.80Å）的 X 射线结构（Hsu 等，1977）. 事实再一次说明，X 射线研究对了解酶机理的精细部分作出的贡献具有本质的重要性（James 等，1977，1981）.

锌蛋白酶和酸蛋白酶水解肽的机理显著的类似（分别见图 5.16 和 5.17）. 在前者，活化酰胺羰基以利于水解的亲电子体是锌阳离子，而在后者是一个质子，它为 Asp-32 和 Asp-215 所共有，又因经过活性部位达到 Lys-308 的电荷中继体系而使它更加亲电子. 在两种情况下，离去的氨基酸的 *N*-端都从一个酪氨酸残基接受一个质子. 对于青霉胃蛋白酶，进攻的亲核体是一个被结合的水分子，通过类比，锌蛋白酶很可能也是这样. 两种酶在结合底物时都发生了相当显著的构象改变.

十肽(*5.56*)能在体外抑制血管紧张肽原酶的证明和一种酸性蛋白酶详细结构知识的得到，除了像苄基丁二酸那样根据机理设计抑制剂的例子外，推理完全与 ACE 类似. 胃酶抑素（pepstatin）及其类似物就是这样的例子.

胃酶抑素(*5.57*)是一种微生物代谢物，能抑制所有已知的酸性蛋白酶．不常见的羟基酸：抑肽酸（statine）(*5.58*)在胃酶抑素分子中出现两次．对胃酶抑素观察到非常低的抑制常数，($K_i = 4.6 \times 10^{-11} mol \cdot L^{-1}$，对胃蛋白酶)很可能起因于抑肽酸与这种酶催化反应假设的过渡态的类似（Marciniszyn 等，1976；Marshall，1976）．

$$E + I \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} EI \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} EI^* \underset{k_{-3}}{\overset{k_3}{\rightleftharpoons}} EI^{**} \qquad (5.1)$$

在一系列的杰出研究中，Rich 与同工作者探查了胃酶抑素及其类似物抑制胃蛋白酶的机理（1980，1982）．方程式(5.1)给出能适合所得事实的最低限度动力学图式．胃酶抑素(*5.57*)和某些较简单的类似体，如三肽(*5.59*)，显示多相式抑制．在可以用停-流技术观察到的形成碰撞络合物 EI 之后，继而形成第二个过渡形式 EI*，而后又缓慢转变成结合得较紧的形式 EI**．过渡态络合物 EI* 的解离常数约为 $10^{-8} mol \cdot L^{-1}$．并非所有结合于酶的胃酶抑素类似体都离开过渡态络合物EI*前进到紧密结合的络合物 EI** 这一步．三肽(*5.59*)的酮类似体(*5.60*)就是这样一个例子．

从分析抑制动力学看，三肽(*5.59*)和胃酶抑素(*5.57*)似乎分别是胃蛋白酶的竞争性和非竞争性抑制剂．但是，更可能两者都是竞争性抑制剂，对于胃酶抑素得出相反的结果是由于对极强的抑制剂，要保证测定体系达到恒稳状态，确定酶抑制的竞争性存在困难．比如，胃酶抑素 $k_{-3} \simeq 0$，而对三肽(*5.59*)来说，k_{-3} 有足够大于零的值，能适应稳态条件．

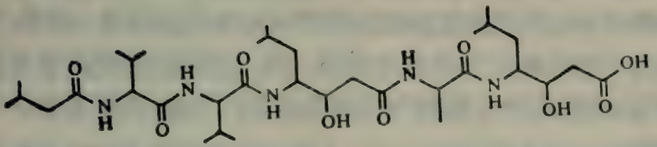
在迄今已发表的对各种胃酶抑素类似体的报道中，我们认为就设计以机理为根据的实用抑制剂而论，三肽(*5.29*)（$k_i \sim 10^{-9} mol \cdot L^{-1}$）包含了最有用的结构信息．

看来已为进一步探查作为根据机理寻找抗高血压药物途径的血管紧张肽原酶-血管紧张肽体系作好了准备．第一个血管紧张

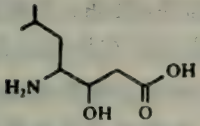
肽转化酶抑制剂的发展将鼓舞所有主张把对酶机理的了解作为药物设计依据的人们.

Pro-His-Pro-Phe-His-Phe-Phe-Val-Tyr-Lys

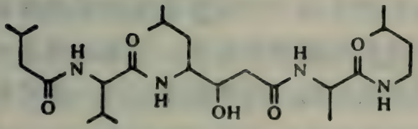
(5.56)



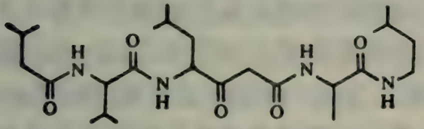
(5.57)



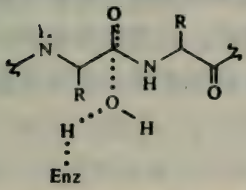
(5.58)



(5.59)



(5.60)



(5.61)

我们已从这些例子看到靶酶的选择多么重要. 它是通向临床上有用药物的关键,但靶酶的选择是不能轻易决定的,至少在考虑新的治疗途径的时候. 酪氨酸羟化酶抑制剂伴有的副作用使得它们不能被接受为抗高血压药物,因为存在其它可供选择的疗法;而

在没有这种选择的情况下，即使某种药物有相当严重的副作用也可能被接受．如果没有我们对作用位点尚未发现时就具有已证明治疗价值的非甾体抗炎剂这样一些药物所取得的经验，那就可能会认为将环-氧合酶作为药物作用的靶子太冒风险．我们是否会像研究 HMG-CoA 还原酶抑制剂那样幸运还需拭目以待．只是因为担心仅有小部分高血压患者会受益，而不是因为这些药物可能有的副作用，使得许多公司放弃了血管紧张肽原酶-血管紧张肽体系作为靶垛．

现代技术，特别是X射线结晶学，提供了酶结构和机理的详细信息，但是总的来说这些丰富的信息还有待药物化学家开发利用．多数原是酶抑制剂的药物起源于化学家修饰那些被认为在细胞过程中有重要作用的结构的想法，或者通过随机筛选的某种变型而被发现．在后一情况，大自然作为一个似乎是无穷无尽新颖结构的源泉有着巨大的价值．甲巯丙脯酸是例外，它是为符合一个酶活性位点的假设模型而特意设计的，这模型来自对一个同系酶结构和机理的研究．

乍看起来似乎微不足道的结构变化能引起结合能和结合模式的显著差别，几乎没有比氨甲蝶呤更好的例证了；在 β-内酰胺的情况则恰恰相反，许多一度认为对于活性很重要的结构特点，在较新的药剂中却并不具备．当前的挑战是能够更好地预见这种结构与活性关系．

几乎可以肯定，血管紧张肽原酶和脂氧合酶的小分子抑制剂将会找到并在临床上得到评价．我们欢迎好药，不管它们从何而来，但是作为药物化学家，自然希望它们更多地依靠合理药物设计，少靠佳运奇缘．

5.3 最近的发展及其在抑制剂设计中的应用

医学上和经济上重要的、通过调节酶活性而发挥生物效应的一些药物，保证了酶抑制在药物研究中的重要地位． 过去 10 年

中，我们对在疾病状态的生物化学有了进一步的了解，以致通常情况下，像我们对 5 -脂氧合酶和血管紧张肽原酶已看到的，在药物化学家开始寻找药物之前，已经认定酶具有潜在的重要性. 这就增加了前面我们已经提到的所谓酶抑制剂从头设计的重要性. 我们已了解分子相互作用的力能学和酶催化反应详细机理方面的基础进展，对于现在和将来设计酶抑制剂的工作将有巨大意义.

如果我们忽略复杂得多的吸收、输运、代谢和排泄等问题，药物设计中的多数问题就还原为小分子与大分子相互作用的问题了. 酶与底物的锁与钥匙的概念已不再是评价分子相互作用的满意模型. 像核磁共振谱、蛋白质 X-射线结晶学、相互作用计算机图示法（graphics）以及量子化学计算等重要工具，在药物化学家测定分子相互作用和利用分子识别进行的研究等努力中，正显示出它们的非常的价值.

药物化学家很少能够得到他希望抑制的特定酶的 X 射线晶体结构. 但是，能得到的酶以及酶-抑制剂络合物的结构数目正在不断增加，提供了许多小分子的底物或抑制剂与大分子蛋白质相互作用的一般性见解（Blundell 和 Johnson, 1976）. 通过了解少数研究得很好的例子的这种相互作用的细节，使得化学家能够制定较好的路线来设计其它酶的抑制剂.

过去存在的问题之一是缺乏有效的方法来形象化、定量化和确定从酶的 X 射线晶体结构所得到的信息. 构建酶的分子模型是费力费时而又昂贵的事情，过去几年中，计算机图示法的一些进展已经有效地解决了这个问题（Langridge 等, 1981；Meyer, 1980）. 药物化学家现在能容易地由原子坐标构建计算机图示的酶模型. 这种模型可以在三维空间操作，蛋白质结构不重要部分可以随意删去，色彩编码的三维活性位点可以用潜在的抑制剂试探. 这种结构可以作成空间-填充模型来观察，最准确地表示立体相互作用，或者作成 Dreiding 式模型，最有效地详示特定的分子相互作用. 原子间距离、立体拥挤和其它一些参量可以简单地定量化.

当然，计算机模拟体系也可以有效地用来构制假设的酶活性

位点，像前面所述 Gund 与 Shen 的环-氧合酶模型那样．每当得到和利用新抑制剂或底物的生物学数据时，反复修改这种模型，使趋向于与实际结构相比，即使不是同样详细，也应使同样有价值的活性位点模型成为可能．

这些模型不仅给药物化学家提供观察酶-抑制剂络合物的有效手段，还可以作为非常详细地考察分子相互作用的基础．量子化学计算，甚至在从头计算的水平，现在运用于相当大的体系也是可能的（Pincus 和 Scheraga, 1981; Sheridan 和 Allen, 1981)．应用这些计算时必须仔细，因为它们还受到很大限制，例如不能准确描述溶剂合效应．但是，它们确实使我们能把一些相互作用，如色散力、可极化度及诱导偶极吸引力等定量化，这些都是化学家在直观处理时存在困难的地方．应用蛋白质残基的点电荷数据库，可以得出静电势能图．通过结构修改可以考察和探查大分子与抑制剂的静电势之间的互补性．抑制剂扭曲变形，使其与酶有利的相互作用达到最大值时，可估计其能量代价．

这种模拟体系的主要优点之一，是使化学家不必实际合成每一个化合物，就能评价潜在抑制剂的被选择的参量．可以考察一个矩阵内的许多抑制剂，就能最有效地处理设计上特定方面的问题，例如立体大小和形状、偶极矩排列、酸度或碱度等等．只要谨慎地将模型与药物化学家在合成方面的专长结合在一起，就能高度有效地探查酶活性位点，加速发现最佳设计的潜在抑制剂．

对酶与小分子相互作用进一步的深入了解正在从酶催化的动力学与热力学的研究和新的解释中得到，像 Kluger 在第二章中从另一种观点加以讨论的那样．

通过两个当今新思维的例子可以领略这一领域中激动人心的发展．Albery 与 Knowles (1977)考虑过去10亿年中酶的演化，他们提出，酶演化的主要动力是效率．在这里不宜沉迷于详细讨论 Knowles 和 Albery 论点的精微之处． 基本上，他们提出演化中的单点变异可能以三种方式影响酶的效率．远离活性位点的酶结构的变化，影响所有内部状态（酶-底物络合物、酶-产物络

合物和过渡态）的结合．这一组内部状态必须相对于未结合的产物和底物状态(外部状态)，在能量上加以调整．内部状态结合太紧或太松都对效率有不利影响．为了使效率最优化，酶可能已发展了某些对结合状态的去稳定化相互作用，以便最优地调节它们的能量．对这些不利的相互作用的认识，可能被用于抑制剂的设计．

为了增加通过体系的流动，按照彼此间相对关系对诸内部状态的热力学加以差分调节,可以对效率作出附加的改进．对于某一给定的酶,底物、中间体或产物等状态可以通过在演化作用下发展起来的一些相互作用被专一稳定化．

最后，增加效率的唯一可能性是，通过降低动力学上有重要作用的过渡态的自由能，改进各基元步骤的催化作用．这可以由将过渡态稳定化，或者将引向过渡态的中间体去稳定化来达到．Knowles 和 Albery 建议，对哪一个是更可能的机理的争议无关紧要,因为在改进特定的催化步骤以后,一切结合状态的改变，将相对于外部状态优化所有内部状态的能量．

Jencks 在他对于酶催化的一些思考中得出了稍有不同的结论（Jencks, 1980)．他认为酶结合底物必须很紧密和准确，得出恰好具有合适几何形状的络合物,以便获得催化作用,只要结合热函没有被大量用来补偿结合时很大的熵损失．因此，观察到的总结合能可能是低的,而且好的底物甚至不如差的底物结合紧密(由解离常数量度).在酶催化反应中降低活化能垒的一个重要因素是底物的去稳定化.后者不一定必须转而表现为过渡态的稳定化,但是基态的去稳定化必须在过渡态中解除．这种想法，以及这些去稳定化的相互作用可以远离反应中心的可能性，相当大地扩展了过渡态抑制剂的概念．

至于酶是如何实现它们令人瞩目的功能的仍存在很大的争议．我们试图仅扼要地介绍两种观点（并冒昧地作了些原作者可能不赞成的改动)．这些对底物与酶之间分子相互作用的领悟,结合对从底物经过渡态和中间体到产物的反应坐标的越来越多的了

解，已开始对设计酶抑制剂用作药物的途径发生影响。

对有效催化作用所必需的高度活化的中间体，酶具有特殊的亲合力，这导致了设计一些本身就是过渡态类似物的抑制剂。这一酶抑制途径已有详细综述（Lienhard, 1973; Wolfenden, 1976, 1980）。已有记载的过渡态类似物抑制剂的实例远超过一百个。这些类似物模拟过渡态的几何形状和电子状态，但不破坏生成产物，时常是很强的酶抑制剂，k_i 值范围可低至 10^{-12}mol·L^{-1}。例如，前面我们已看到的胃酶抑素，一种酸性蛋白酶的强抑制剂，就可以模拟多肽水解中的四面体中间体。

使得有可能设计过渡态类似物作为酶抑制剂的机理信息，也可以用来设计以机理为根据的酶去活剂。这些抑制剂也称为自杀性底物，它们利用了这样一个过程，可概括为：先诱使酶接受一个潜在抑制剂作为底物，在诸反应步骤中产生了一个使酶不可逆失活的反应性中间体。β-内酰胺酶被棒曲霉酸抑制是一个重要的例子。最近的几篇综述中有许多其它的实例（Rando, 1975; Abeles 和 Maycock, 1976; Walsh, 1982）。

这一途径提供药物设计的令人鼓舞的可能性，但也受到一些批评或非难。Walsh（1982）曾叙述一些以机理为依据的抑制剂，作为合理设计在体内有最高专属性的药物的基础。这对于不可逆的酶去活剂很可能是对的；但是却没有证据说明自杀性去活剂将表现胜过强力可逆酶抑制剂，有增高的专属性。此外，对于在体内不可逆地修饰蛋白质在免疫上的后果，以及当靶酶属于宿主而不属于入侵的微生物，而重新合成该酶的速度又可能很慢时，这种抑制剂超过剂量所提出的一些特殊问题，都还有些令人担心。以机理为依据的酶抑制，成功的重要因素之一是这样一个分配比，它量度每次去活事件中，一种自杀底物被处理，不损害酶分子而释放产物的次数。如果反应活性中间体来得及从酶扩散开，或者自杀底物转变为无害的产物多于转变为反应活性中间体，这个分配比可能高。第一种情况表现潜在的毒性问题，第二种情况表现潜在的力度问题。

潜在的过渡态类似物和自杀性底物正受到药物化学家的极大注意．但是，药物开发有这样的滞后期，可能还要过几年化学家的努力才会得到商业上成功的报酬。

第六章　生物体系中的金属离子

Donald H. Brown 和W. Ewen Smith

(Department of Pure and Applied Chemistry,
University of Starthclyde, Glasgow, UK)

6.1　引言和一般化学原理

金属离子生物作用的研究在医学、药物学和毒物学中已有悠久历史，但是只到最近才认识金属离子卷入的程度和多样性．例如，已证明在过渡金属中 V，Cr，Mn，Fe，Co，Ni，Cu，Zn 和 Mo 等元素是生命必需的，Au，Pt，Pd，Ir，Os，Ti 和另外一些元素或者已被用在治疗上，或者被认为有治疗价值．为了明确和防治毒性，多数过渡金属已经被研究．作为这些发现的后继，许多容易得到的金属离子现在正在由于这样或那样的理由在生物体系中被研究．

由于无机生物化学是一个包含许多不同问题并有社会意义的领域，越来越多的具有多种专长的化学家被吸引进来．在制备方面，一些特殊金属蛋白的孤离激起了许多模型化合物的制备和反应性的研究，如正方平面钴络合物(参考维生素 B_{12})和铁硫簇(参考铁氧化还原蛋白)．电子光谱学家已被像“蓝”铜蛋白中发现有很高吸收系数这样一些问题激起了兴趣．动力学家被卷入许多金属酶催化活性的研究，而理论化学家一直在考察金属中心特殊反应性的原因．因此，正是生体内化学提出问题的多样性，为学术研究者提供了有利的气候，因而增加了投入的力量和取得了成果．然而，含金属的蛋白质的化学是复杂的，而且我们对在蛋白质环境中金属离子的作用了解是很零碎的，其中对某些过程的了解可能比

对另外一些好得多.这一方面是由于某些金属存在的浓度很低,其中金属的检测和定量本身还是现在正在研究中的问题，另一方面是由于要将体内作用与体外确定的活性相关联存在固有的不确定性. 关于某些选定的和已被纯化的体系,如像含血红素的蛋白质、辅酶维生素 B_{12} 和羧肽酶之类的含锌酶，已经有很多报道，但是关于金属离子化学对我们了解生命体系的影响这样一个一般性问题，还只作了范围很有限的考察. 在本章中我们将集中叙述广泛范围的含金属的物种,特别是关于金属离子的代谢、输运和病理学等方面我们的理解.

无机化学应用到生物学有两种很不相同的途径. 第一，有可能而且在某些情况下必须考察金属离子化学影响完整哺乳动物体系,整个器官或细胞的方式. 例如，某些正方平面铂（II）络合物是有效的抗癌剂（Lippard, 1983)，但只是具有特定的配体活动性的顺式络合物才有高活性,而且现在一般认为,这些络合物通过取代两个较活动的配体,桥接到 DNA 上两个碱基之间,从而发挥作用. 这一提法得到了体外研究的支持，它们证实了这类反应在细胞中是可以发生的.

第二,在许多实例中,成功地在体外研究了保持在特定蛋白质的很确定的环境中金属离子的化学. 也有许多研究实例，其中已被很好表征的酶又在体内它们必须起作用的环境中再被研究. 在这里将对一些单个元素讨论这两种途径，两个已被较详尽研究的元素,即铁和铜,提供了多数单个酶研究的例子.

关于金属在体内的行为,常被非化学家忽视的一个方面是,它们的化学实质上是被络合离子的化学,不论在考虑中的是像 Na^+ 或 K^+ 这样极性较大的离子,还是像 Au(III) 或 Pt(II) 这样有较多共价性的物种. 因此，在体内金属离子的一些性质如像有效大小和溶解度等等都是金属离子本身以及存在的配体和溶剂的函数. 此外,对于许多酶和蛋白质中特定的含金属的位点的功能,在体内各种分隔空间中金属离子的平衡是重要的. 例如，若是某种金属离子的浓度高出标准很多,就可能发生输运位点的阻塞,并且

能出现通常被认为起因于其它金属离子耗尽的一些症状.而且,金属离子的分布受到体内天然存在的一些低分子量配体或蛋白质中络合位点浓度改变的影响. 可能类风湿性关节炎就是这种情况的例子,在此病中,血清组氨酸和白蛋白硫醇的水平显著地低于正常人. 然而,这对于疾病过程的影响迄今知道的还很少.

在生物体液中有许多能络合金属离子的物种. 例如, 在血清中有氨基酸、低分子量多肽和蛋白质的许多对于铁和铜的络合位点,数目比金属离子多得多,因而在体内这些离子的化学是存在于过量竞争络合基团之中的离子的化学. 因此, 研究络合在决定生物体液内过渡金属离子可能的分布和反应性中的作用近来已得到相当大的推动.

在考虑体内活性时暴露出的一个主要问题是, 即使可以预料就浓度而论最可能的络合物物种, 并且可以测定这些物种的相对丰度,但这些信息可能有,也可能没有与生理活性的直接关系. 在生体内存在着多种的微环境, 预料每一个都按与特定溶剂或特殊表面上离子的吸附几乎相同的方式影响金属的化学. 例如, 像铜这样的过渡金属与氨基酸反应, 在乙醇中形成的络合物与在水中形成的大不相同, 这是由于络合物溶解度的改变, 以及水与乙醇作为配体的强度不同. 在体内这些微环境常常是被膜障壁分隔开的, 特定的络合物能透过而离子和其它大小、电荷等不同的络合物则不能透过这种膜. 已提到过的含铂药物是如下情况的一个例子,据认为体内存在的金属离子只有一小部分是在活性物种中.服用的是毫克量,但是虽然据信是在 DNA 上起作用, 而与存在的 DNA 分子相比只有较少数的铂离子到达细胞核. 其余的铂被别的细胞内和细胞外成分络合,或被迅速排泄.

这些问题在过去时常被看作忽视无机生物化学的理由, 但是对无机化学的理解增多和许多更有力的物理方法的出现, 意味着多得多的问题能够以相当大的成功机会被研究. 在考虑个别金属体系之前, 看来值得略述某些特别关系到过渡金属离子发展起来的基本原理.

金属离子分为"硬"和"软"酸是根据它们在体外的反应，但在讨论体内金属离子的化学时也是有用的."硬"金属离子是小的、不容易被氧化或被还原，或带有相对高的正电荷，例如 Na^+，K^+，Mg^{2+}，Ca^{2+}，Cr^{3+}.反之，"软"金属离子是大的，带低的正电荷，例如 Cu^+，Au^+，Hg^+，Cd^{2+}，Pt^{2+}. 处在这两端之间的有二价的第一排过渡金属离子.通常"硬"金属离子优先与氧和氮给体络合，而"软"金属离子倾向与硫和磷给体络合. 这个原则难以绝对地应用，但在相对意义上它是很有用的. 例如，铜（II）比铜（I）"硬"，因此，后者比较容易同硫醇配体络合. 而像血浆铜蓝蛋白(caeruloplasmin）这样一个氧化还原酶，在其中要求铜的两个氧化态都是稳定的，就用混合的硫同氮或氧给体原子来络合铜."硬"和"软"金属离子之间的差别在表 6.1 中所列必需的金属离子的生物化学性质中得到反映.

表 6.1 金属离子的分类

Na^+,K^+	Mg^{2+},Ca^{2+}	过渡金属离子
电荷载体	结构形成物	氧化还原催化剂
	触发物	路易斯酸
活动的	半活动的	静止的
氧负离子结合	氧负离子结合	O-N-S 配体
弱的络合物	微强络合物	强络合物
很快的交换	中等快的交换	较慢的交换

根据定义，过渡金属具有部分填充的"d"轨道.因此，严格地说，锌（II）（d^{10}）不是一个过渡金属离子，但是把它包括在这一节，即使不严格准确，却是方便的. 使得过渡金属离子特别适合上面提到的反应类型的一些性质是：

（a）它们是很好的路易斯酸，可以同氮、氧和硫等给体的配体形成范围很广的络合物.

（b）由于有未充满的"d"轨道，它们具有可用于氧化还原反

应的、容易达到的一系列氧化态.

后者或许是生物体内主族和过渡金属离子的主要差别，但是，过渡金属离子成键的较多共价性同时产生较具方向性的键和化学性质上相当特殊的一些变化，这些化学性质是络合物的而不单独是配体的函数.

多数第一排过渡金属离子倾向于八面体立体构型，或在较小程度取四面体形状. 但是，当只有一单个 d 电子时可能倾向扭变的结构. 例如，在超氧化物歧化酶中铜（II）是一个 d^9 离子，已发现它存在于扭变的四边形位点，而锌(II)是一个 d^{10} 离子，它偏向四面体位点.主要取决于蛋白质环境的性质，平面正方构型和其它一些特殊的几何形状是相当常见的，结果使金属大小的改变能决定性地影响其离子的反应性. 第一排二价离子在 Mn^{2+}[0.08nm(0.80Å)] 处有最大离子半径，在 Ni^{2+}[0.068nm(0.68Å)] 处有最小离子半径. 氧化数的增加通常引起离子半径的减小，如 Mn^{3+}[0.066nm(0.66Å)]. 结构改变能影响像氧化还原电位等其它一些性质，而酶的催化活性位点常常是按像铁氧还蛋白簇或平面的血红素体系这样一些几何形状形成的，可以认为这些形状在体外化学中比较不常见.

存在于这些络合物中的配体能够依靠它们的电子结构及立体选择性影响络合物的反应. 例如，$[Co^{3+}(NH_3)_6]^{3+}$ 被卤化物配体取代得出稳定性次序 $Cl^- > Br^- > I^-$，而对于 $[Co^{3+}(CN)_6]^{3-}$ 次序是 $I^- > Br^- > Cl^-$. 这是因为 NH_3 配体与 CN^- 相比，相对较硬，而络合物的硬度受到配体影响，改变了钴对硬或软配体的亲合力. 可以提出类似的论点来解释羧肽酶中锌相对较软的行为.

考察络合物的稳定性有两种方式，即动力学的和热力学的.动力学方面常常可以根据起始络合物和反应中产生的过渡态的配位场稳定化能来解释. 例如，Co^{3+}，Cr^{3+} 和 Ni^{2+} 比其它第一排过渡金属离子反应较慢. 热力学方面与金属离子的大小和它们的络合物键合特性的改变有关. 由此产生了同一个配体与不同金属离子之间形成的各个络合物的稳定常数次序. 这个序列被称为

Irving-Williams 次序，即 $Cr^{2+} < Mn^{2+} < Fe^{2+} < Co^{2+} < Ni^{2+} < Cu^{2+} > Zn^{2+}$。后面这种效应有明显的重要性，因为稳定常数差别，比如说铜（II）和锰(II)与同一种配体的络合物，可能达到 10^3 至 10^5 的数量级，因而如铜离子没有被其它配体控制，可以用得上的话，铜将取代锰。

过渡金属离子的研究有一个胜于碱金属的有利之点，即由于未配对电子的存在，可以应用多种物理方法，包括紫外-可见光谱、ESR 谱、磁测定等。通过这些技术和像 NMR 等一些其它方法，在阐明过渡金属离子在许多酶反应中的作用上已取得了很大进步。

6.2 过渡金属元素：(1) 铁和铜

6.2.1 铁

铁是人体中最丰富的过渡金属，在成人身体中有大约 3—4 克。约 60% 的铁作为血红蛋白在体内循环，10% 作为肌红蛋白，1% 分布在铁传递蛋白和其它一些酶中。其余部分主要是在贮铁蛋白质：铁蛋白（ferritin）和血铁黄蛋白（haemosiderin）中。

铁的水溶液化学主要包括两个氧化态——亚铁[铁(II)]和正铁[铁(III)]。亚铁是一个弱还原剂，在水溶液中容易被分子氧所氧化。正铁（III）除非被强有力地络合，在水溶液中和生物 pH 下将被沉淀为多聚氢氧化物。铁（II）和铁（III）两者能同含氧、氮、硫给体的配体形成很多种络合物。铁（II）是 d^6 离子，铁(III) 是 d^5 离子。二者都能以自旋成对或无自旋物种的形式存在。虽然已知有为数不多的四配位和五配位络合物，但是对于铁的两种氧化态，六配位是优先选择的几何形状。某些铁（III)与含氧配体如邻苯二酚的络合物对取代反应是不活泼的，而一般地说，高自旋的铁（II）络合物比它们的铁（III）对应物较为活泼，此外，铁（III）的氢氧化物在 pH4 以上的水溶液中是不溶的。这些溶解度和反应性上的改变可在体内铁的传递和贮存中被利用。

铁主要由肠道吸收到人体内. 如果铁过量，通道部分地被阻塞,引起铁蛋白的蓄积. 据认为，由于铁主要以铁（II）的形式被吸收,而膳食中的铁通常是铁（III），吸收之前必须被还原和分散(Forth 和 Rummel, 1973). 例如,抗坏血酸增加铁的吸收，显然是通过将它还原和络合. 像 EDTA 这样一些强络合剂则有相反的作用，可能是因为它们与吸收位点强力地竞争可利用的铁. 同样,以蔬菜为来源的铁不容易吸收,可能是由于与植酸和草酸形成强的络合物. 反之,来源于动物的铁可较好地被吸收,因为大部分是血红素铁,不需改变就很容易被吸收.由蛋白质消化得到的多肽和氨基酸的存在有助于吸收，可能是通过形成具合适稳定性的络合物,使得随后能与肠道中的铁贮存蛋白质交换铁离子.

铁是通过铁传递蛋白(一种 γ-球蛋白)由肠道中被传递出来. 有人提出，铁被铁传递蛋白摄取涉及含铜的血浆铜蓝蛋白将铁(II) 氧化为铁（III）的作用，而且被认为是缺铜能引起贫血的原因（Mareschal, Rama 和 Crichton, 1980). 然后,铁传递蛋白把铁递交给骨髓、铁贮存点和其它组织. 在这些器官中进一步的传递又被认为涉及铁（III）再还原为较活泼的铁 (II). 铁传递蛋白又能将网状内皮系统中血红素分解代谢产生的铁，再循环进入骨髓中的成红细胞. 对于铁传递蛋白的生物合成，铁起着负反馈作用,因而在缺铁时有较多蛋白质在循环(测得较高的总的铁结合能力),但相对和绝对的铁含量减少. 因此,在决定贫血类型时,总铁和铁结合能力都要测定. 据认为铁传递蛋白没有任何在传递金属离子以外的其它作用. 它与卵清蛋白和乳(正)铁蛋白（lactoferrin）的关系是，所有这三种蛋白质都具有类似的氨基酸顺序和强的结合两个正铁离子的能力.

人体中主要贮存铁的蛋白质是铁蛋白. 这样一个贮铁库是必要的,为的是给许多需铁的分子提供铁的来源,也为了限制游离铁的浓度. 这些需要解释了在多数生物体中存在铁蛋白的原因. 铁进入细胞经常被认为是刺激脱铁铁蛋白（apoferritin）的合成.此蛋白质为外径约 12.5nm (125Å) 的圆球形，具有直径约 8.0nm

(80Å)的内腔. 此结构由 24 个多肽链成对排列的对称装配体所构成,其中每一对都处在一个正十二面体的表面上 (Banyard, Stammers 和 Harrison, 1978). 在六个角顶有对过约 1nm (10Å) 的小间隙. 它们提供了铁的输运通道. 中心腔穴有容纳 4000 个以上正铁离子的容量,其中铁以通式为 $(FeO \cdot OH)_8(FeO \cdot H_2PO_4)$ 的铁 (III) 氧化物/氢氧化物/磷酸盐的聚集体形式存在. 这些聚集体有不同大小, 并且每个分子中可能不止一个. 它们的取向似乎与蛋白质外壳无关. X 射线外延吸收边界精细结构(EXAFS)测定指出,每一个铁原子被 6 个氧原子配位. 在生物 pH 下很容易形成多聚氢氧化铁 (III),若不加以限制,将变得太大,不适合蛋白质外壳. 为了防止这种情况,脱铁铁蛋白并入亚铁,然后它们在蛋白质外壳内被氧化再聚合. 铁的释放很可能包括还原到铁 (II). 还原配体必须通过与铁 (II) 并入时相同的通道接近铁 (III) 核心. 实验发现许多还原剂,如巯基乙酸、半胱氨酸、抗坏血酸和还原型核黄素, 都能除去铁 (Crichton, 1973). 铁蛋白也可以在溶酶体中降解,在这里蛋白质外壳被部分消化,留下一种微晶的铁 (III) 残余物, 其组成与原来存在于铁蛋白中心的类似. 此物被称为血铁黄蛋白,它是在动物中发现的第二种贮铁形式. 在缺铁时,铁蛋白和血铁黄蛋白水平下降. 当铁贮藏逐渐消耗时, 铁传递蛋白浓度和饱和度改变. 假如吸收了过量的铁,或红细胞寿命减短,就会在许多组织中出现铁蛋白和血铁黄蛋白, 终于在那里发生损伤. 看来没有除去过量铁的天然途径.

在体内, 最重要的一个铁配位几何形状是血红素的结构 (图 6.1), 其中卟啉环的特性赋予在它中心的反应活性铁以特殊的性质. 所产生的独特化学已引起许多研究, 试图解释血红素类在生物学上的功能及其物理性质 (Harrison 和 Hoare, 1980). 例如, 在人类血液中循环着的血红蛋白, 其作用是保证在肺中有效地摄取氧, 同时在体内需要氧的地方有效地把它释放出来. 血红蛋白的性质使得它在肺中被氧饱和时不大受加载压力改变的影响, 而在组织中氧的卸载却对局部缺氧情况是敏感的. 这个行为与血红

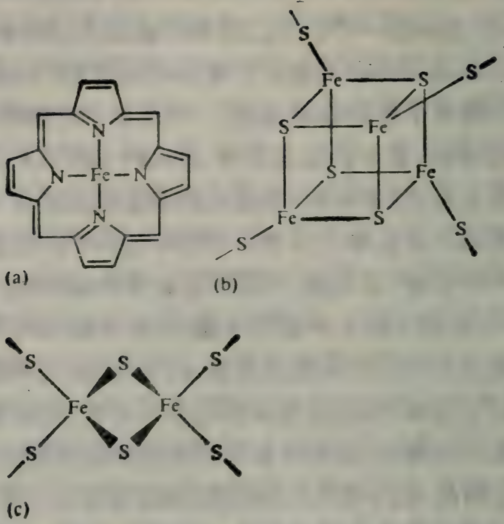
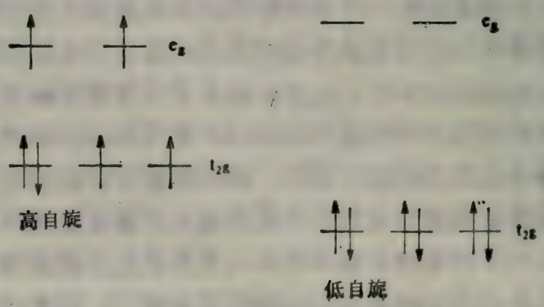


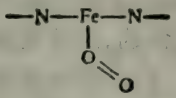
图 6.1　在生物体系中发现的几种含铁体的几何形状

(a) 血红素；(b) 铁氧化还原蛋白；(c) 红铁硫蛋白(rubredoxin).

蛋白四个亚单元之间的协同相互作用有关.血红蛋白含有亚铁,能与氧反应生成二氧络合物. 它能被氧化到活性较小的三价铁形式,即正铁血红蛋白. 由磁测定推想,脱氧亚铁络合物是一个高自旋络合物,而氧合后的形式是一个低自旋络合物,e_g 轨道比 t_{2g} 轨道稍大一些,因此高自旋铁(II)的形式要放进血红素环嫌太大,故位于平面的稍外边一些.



据信与分子氧络合形成如下成一角度的金属-氧键时：



铁移进环中，引起环稍微折皱和蛋白质结构的一定改变。

人的血红蛋白是四聚的，铁进入血红素环平面中的移动，通过蛋白质中一系列相互作用而传送到其它亚单元中的血红素体系，由于有利于低自旋构型而增加它们对氧的亲合性。反过来，由脱氧位点来的信息也将被传送，并且倾向于使低自旋氧络合物比高自旋脱氧络合物较不稳定，因此有利于络合物分解，导致氧的释放。

还有许多其它生物上重要的血蛋白，通常涉及氧化还原或电子传递功能。例如，分子氧可以在蛋白质内被细胞色素氧化酶以这样的方式还原为过氧化物，即要保护环境免受活性中间体，如超氧化物或氢氧自由基的攻击。在一些羟基化反应中也涉及细胞色素 P-450 和有关蛋白质。

在蚯蚓血红蛋白 (haemerythrin)(一种海洋生物的氧传递色素)中的铁原子行为稍有不同。尽管有这样的名称，这个蛋白质并不含血红素基团，它的一些铁原子被包含在单一的多肽链中，相距大约 0.35nm (3.5Å)。每对铁原子结合分子氧的亲合力与血红蛋白类似，但相反的是，不同络合位点之间几乎没有协同作用。据认为，分子氧桥接两个处在高自旋铁 (II) 状态的铁原子，得出形式上可描述为两个铁 (III) 原子被一个过氧基团桥接的结构。两种形式都能容易地被氧化为含成对铁 (III) 的脱氧正铁蚯蚓血红蛋白 (methaemerythrin) (Klotz, Klippenstein 和 Hendrickson, 1976)。

另一类重要的含铁蛋白质是所谓"铁-硫"蛋白 (Sweeney 和 Ranbinowitz, 1980)。它们通常含有等数的非血红素铁和硫化物离子(图 6.1)。它们的功能与其说是底物转化，不如说是电子传递，其实例包括铁氧化还原蛋白和一些高电位铁蛋白。它们参与细菌

中的许多反应，如固氮、ATP生成、光合作用的电子传递，并且在较高等生物体的黄嘌呤氧化酶以及硝酸盐和亚硫酸盐的还原中起一定作用.硫化物离子是活动性的，因为用酸处理时能够以 H_2S 的形式被排除. 这个试验可把它们与同样键合到铁原子上的硫醇基区别开.通常发现有三种不同类型的铁-硫簇：（a）两个铁原子带两个桥接硫原子；（b）具有交替铁和硫原子的六员环；（c）在角顶具有交替铁和硫原子的立方体. 在每种情况中，铁-硫簇都是通过半胱氨酸残基连接到多肽链上，残基的硫络合到铁原子上. 一个铁-硫基团被包埋进多肽中，使其它一些原子紧密靠近，结果常引起从蛋白质的酰胺到硫化物基团之间形成氢键. 氢键的程度似乎在控制铁-硫簇工作的氧化还原电位上是重要的. 在每一个铁-硫中心中有两个可以达到的氧化还原态，它们之间的差相当于一个单电子变化，因此可发生电子转移.

由特殊环境引起的很特殊的生体内化学已激起对铁络合物的许多研究. 或许对具有不寻常氧化还原和配位性质的血红素体系给予了最大注意，但是近来铁氧还蛋白还原分子氮的能力导致了对这类型簇体系更广泛的研究.这些研究已产生一些新颖的结果，并且也许提供了一些最好例子，说明随着我们对其它金属离子物种配位和作用模式知识的增加，可以预期生物化学影响于无机化学的方式.

6.2.2 铜

铜与金和银一起是 IB 族元素的成员. 虽然铜在某些方面是典型的过渡金属，但它也有几种特有的性质. 在正常条件下，铜可有四个氧化态. 铜(0)(即金属铜)是相对惰性的，例如可用于输水管道. 然而，在氧和强络合配体存在下，铜(0)容易溶解. 这方面的一个例子是金属铜容易溶在氨基酸的水溶液中. 据说这是铜镯治疗法的机理，铜(0)被汗中的氨基酸溶解，然后铜-氨基酸络合物被吸收.

铜（I）主要形成具基本上四面体和八面体结构的 4 和 6 配位

的物种*. 除非被软配体如硫醇或硫脲等络合，它在水溶液中不稳定，但在某些非水溶剂(乙腈)中是稳定的，不溶的铜(I)络合物容易由水溶液制备. 作为一个 d^{10} 离子，没有未配对的电子，结果使铜(I) 的检测比铜 (II) 困难，它在体内的作用受到的注意也少得多. 然而，体内软的硫醇络合位点和非水环境对铜 (I) 是合适的，并且它已在特殊的蛋白质，如血浆铜蓝蛋白和金属硫因 (metallothionein) 中被鉴定出来.

铜的最普通的氧化态是铜 (II)，作为一个 d^9 离子，它的络合物时常是被扭变的，引起不相等的键长和键角以及多种可能的几何形状.因此，在生物上铜 (II) 占有独特的位置.由于它的络合物的相对稳定性，要求在生物体液中活动铜保持在低浓度，否则它将取代其它过渡金属离子，如 Mn^{2+} 或 Zn^{2+}. 铜 (II)又形成二聚的物种，典型的例子是乙酸铜(一种带有桥接羧酸基团的二聚体)，而二聚的络合物也存在于自然界. 例如，在血蓝蛋白中，氧分子是以桥接在两个铜 (II) 离子之间的形式被运载的，不是像名称 haemcyanin 可能暗示的那样，由血红素 (haem) 基因运载.

铜 (III) 是相对罕见的，仅能被 O^{2-} 和 F^- 这样一些硬配体稳定化，像在 $NaCuO_2$ 和 K_3CuF_6 中那样. 铜 (III) 是否在生物中有什么作用现在还不知道，但是在体外可以形成含铜 (III) 的铜-白蛋白络合物，其中硬配基据认为是蛋白质链中的 N^- 原子，N^- 表示在金属-氮键中氮在形式上的状态.

铜 (I) 通常在水溶液中迅速氧化到铜(II)，因此，发现它最大可能是已被硫醇络合，或在富脂的组织中，或在其它非水环境中.然而，与某些教科书中的叙述相反，铜 (I) 能在水溶液中被硫脲之类的软配体稳定化，而硫醇在体内与蛋白质的非水性质相结合，也可能使铜(I)能在水性隔室中存在.贮存蛋白金属硫因可能是一个例子. 另一方面，铜 (II) 在水溶液环境中被氯化物、水、羧酸盐或氨基酸络合，却是稳定的. 然而，由于酶中的许多原子被包含在氧

* 应当是铜(I)形成配位数 2,3 或 4，分别具线形、平面三角、平面正方或四面体结构的络合物. ——译者注

化还原体系中，它们的配位圈常常是由硬和软配体混合组成，在此配位圈中铜的两个氧化态都是相对稳定的。对于硫醇-铜络合物的 CNDO 计算指出，从铜（II）变到铜（I），加上的那个电子被分布到与铜也与配体相联系的分子轨道上，所以在这种络合物中说到形式上的铜（I）和铜（II）或许没有什么意义。

铜被认为主要是在肠道中被吸收。虽然其化学途径到现在还不清楚，但已提出了两条路线。第一条包括低分子量的铜络合物的扩散和被白蛋白输运到肝脏。第二条设想为了铜由肠道输运开去，低分子量，高含硫量的蛋白质金属硫因担负着主要角色，这一机理现在占优势，因为已知高锌（II）含量的膳食能阻碍铜的吸收，而锌（II）被认为是通过金属硫因输运的。锌阻碍铜输运的作用已被应用于临床上控制铜的吸收。在反刍动物中，钼（特别是硫钼酸盐）对铜的吸收有拮抗作用，比较不容易理解（Bremner 和 Mills，1981），可能又一次涉及金属硫因。硫钼（VI）酸盐容易被还原为一种二聚的用硫桥接的钼（V）物种，已知它能同半胱氨酸形成强络合物，半胱氨酸是金属硫因中的主要氨基酸。不过现在关于膳食铜吸收的工作还不足以确定是否涉及这一类型的物种。

铜蛋白在广泛的代谢途径被涉及，表 6.2 中列出了某些例子。表中所列功能或许可说是提示性的而并非全面列举，因为许多酶是多功能的。例如金属硫因也是锌的一种贮存蛋白，也许还是一种防卫蛋白，能对抗某些重金属离子，如像镉（II）的毒性效应。血浆铜蓝蛋白每个分子中含有多至六个铜原子，已被多种多样地描述为贮存蛋白、铁流通化中的过氧化酶、输运蛋白、血清抗氧剂等（Frieden，1980）。还不知道这些功能中是否有某一个是主要的，而其余是附带的。在讨论超氧化物歧化酶中产生了一个稍有不同的论点（Michelson，McCord 和 Fridovich，1977）：这个酶有效地催化以下反应：

$$2O_2^- + 2H^+ \longrightarrow O_2 + H_2O_2$$

似乎很奇怪，在红细胞中需要浓度为 $3\mu mol \cdot L^{-1}$ 的这个酶，添加到浓度高得多（$2000\mu mol \cdot L^{-1}$）的谷胱甘肽上是另一个有效的自

表 6.2 铜蛋白

贮存，输运	金属硫因
分子氧传递	血浆铜蓝蛋白
	血蓝蛋白
电子传递	可可碱乙酸钠
	质体菁
	星蓝蛋白
单氧合作用	多巴胺-β-单氧酶
双氧合作用	吲哚-2,3-双氧酶
超氧化物歧化	超氧化物歧化酶
底物被 O_2/H_2O_2 氧化	胺氧化酶

由基清除剂.因此，对超氧化物歧化酶在保护细胞对抗自由基攻击中的一般性作用不免产生疑问，除非它是被定位来保护迄今未知的某个特殊的细胞位点，或在那个特殊位点产生过氧化物.

虽然这些酶的具体功能还存在未解决的问题，但在它们多数中，铜的作用似乎与氧化还原反应有关.近来对许多这些酶的结构测定已足够精确，能揭示紧靠铜的环境，导致对铜在不同蛋白质环境中的氧化还原功能有较多了解.例如，质体菁的结构表明铜是在稍扁平的四面体中，这被看成是处在对铜（I）和铜（II）常见的几何形状的中间（Colman 等，1977）.四个配体是通过咪唑氮络合的两个组氨酸，以及通过它们的硫络合的甲硫氨酸和半胱氨酸.星蓝蛋白被认为具有类似的结构，但两个硫都来自半胱氨酸.因此，结构和络合配体的细微改变就会使酶具有不同的氧化还原性质.铜的位置靠近酶的表面，但并不是恰在表面上，产生对铜进一步络合作用的立体限制.靠近铜已鉴定出各别的阴离子和阳离子的络合位点，其作用似乎主要是电子传递.

在蟹和其它某些甲壳动物血液中用来输运氧的一类蛋白质——血蓝蛋白类表现为另一类型的机理.这些化合物的结构随其来源不同而有差异，而且它们的功能是复杂的.但是，在每一情况下，铜似乎都是按 $O_2/Cu=1:2$ 的比起着分子氧载体的作用.不含铁的氧传递酶蚯蚓血红蛋白中，如前所述，O_2/Fe 比同样是

1:2. 铁和铜在氧传递中所起作用表观上完全相似,其理由至今还没有得到解释.

多功能酶血浆铜蓝蛋白中的铜也许最好地说明铜的反应和环境的复杂性 (Frieden, 1980). 这个酶占循环血清铜的 95% 以上,又因为在某些疾病中它的浓度有起伏,在化学和医学两方面已激起了相当多的研究工作.它的结构还没有被完全阐明,但是主要由 ESR 和电子光谱已推导出对六个铜原子周围环境的某些概念.铜原子被分为四个不同类型. 类型 I 是一种伴有可检测 ESR 信号和强蓝色的铜(II)离子;它的环境可能与上述质体菁的 (图 6.2)

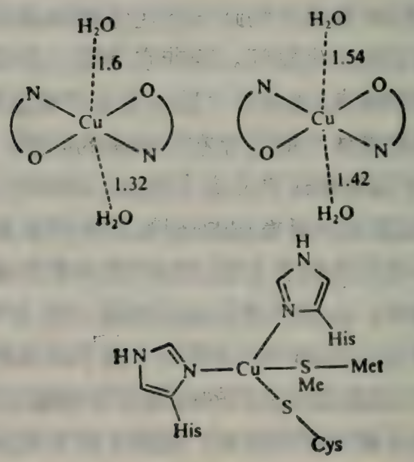


图 6.2 在络合物中铜 (II) 的几何形状可能被相当大地改变
图示在顺式和反式双丙氨酸铜(II)络合物中水分子所呈现的不同键长和键角,以及在铜蓝蛋白如质体菁中的位置.

相似. 据认为在每个血浆铜蓝蛋白分子中有两个这类型的铜. 类型 II 也是铜 (II),是 ESR 可检测的,但不伴有强的蓝色;它看来容易络合阴离子. 类型 III 的铜被认为还是铜 (II),但因它不是 ESR可检测的,很可能是具有桥接配体的被偶合的一对.类型IV的铜是为补足总铜含量所必需的,但对于它所知极少.由于血浆铜蓝蛋白中铜原子的数目是有变动的,这最后一类铜可能伴有铜的传

递．有证据表明，在某些疾病状态，如急性类风湿性关节炎中，血浆铜蓝蛋白分子的铜含量降低，但分子的活性没有改变．

生物学对铜化学的影响，主要是在似乎已有适当知识而后来关系到特定生物活性又提出了一些更专门问题的领域，刺激了更专门的研究．例如，一些铜(II) 络合物的几何形状预期是扭变的八面体，但是氨基酸的不同形状影响这种扭变方式的问题，还是不很清楚的． 这种影响经验式分类的一个很好的例子是 $CuL_2(H_2O)_2$ 型的氨基酸络合物，对此已有多种化合物的详细结构分析可以利用（Freeman, 1967)．配体对水分子的位置有相当大的影响，并且每个已被研究的络合物各不相同，但是概括地说，它们可分为如图所示的两类(图 6.2)．

像铁的情况一样，对铜的生物作用不断增加的了解导致了模型化合物研究的大量增加，它们被设计来模拟体内铜所起作用的某些方面．例如，铜的席夫碱络合物被认为在一些依赖吡哆醛的酶过程中，还可能在胶原蛋白被赖氨酰氧化酶交联中，是关键的中间体(Harris, DiSilvestro 和 Balthrop, 1982)．应用含硫的氨基酸就得到比用丙氨酸等更复杂的一系列产物，并且使我们想到，像多数这些体系的情况一样，要使体外知识能够开始对体内行为作出解释，还要作很多工作（MacDonald, Brown 和 Smith, 1982)．发现像星蓝蛋白等一些蓝铜蛋白的位点的性质，导致了以这一类为基础的模型体系的研究，并且也研究了铜络合物作为氧载体的作用．此外，铜位点的催化作用有时能在体外进行有效的研究．例如，铜的氨基酸络合物有超氧化物歧化酶的功能．在医药上，对涉及过量铜累积的 Wilsons 病，合成了为络合和除去铜特为设计的配体；又发现，阿司匹林酸铜是比阿司匹林更有效又较少致溃疡性的抗炎剂，导致了这类络合物化学的重新研究和扩展 (Sorenson, 1982)．

这种研究中的另一个限制因素是，生物体系中铜的化学至今还不是很清楚．例如，在铜的吸收和分布的讨论中，没有记载铜的氧化态的变化，看来很可能，假定非水环境和有许多巯基存在下，

铜将常常以铜（I）的形式存在，并且人体将按与铁类似的方式利用铜（I）与铜（II）的不同性质．然而，检测铜（I）及铜（II）的某些形式是困难的，显然，对这些变化的精确了解还需要一段时间，这还可能要求属于化学而不是生物学范围的一些技术的改进．

6.3 过渡金属元素：（2）其它金属

某些其它金属，如锌和钴，能够像铁和铜一样详细地、同样好地加以考察，但是像钒这样一些金属作用化学的了解，则还处在初期阶段．不过，为了确立金属离子化学与酶化学之间的关系已说的够多了，因此以下将只考察关于其它金属作用的一些主要之点．象钒和铬这样一些元素的情况，主要着重点将放在它们在哺乳动物体系中化学作用的合理解释上，而对于钴和锌，可以考察对一些特定的酶专门得多的研究．

6.3.1 钒

对钒化学的兴趣是由一项实验观察引起的，即由不同公司供应的 ATP，按钠泵工作所需要的 Na^+/K^+ ATP 酶（腺苷三磷酸酶）活性而论，给出了不同结果(Karlish, Beauge 和 Glynn, 1979)．样品之间的差别之一是，活性较小的 ATP 中存在钒，而且进一步的实验证明，钒选择性地抑制 Na^+/K^+ ATP 酶．钒酸盐形式的钒似乎是按阴离子输运机理被输送进细胞中的．在细胞膜的内表面，钒酸盐似乎同钾协同地作用，刺激钾离子的结合．这么做时，它改变了钠/钾泵对外部钾离子浓度的响应，以致使钾由刺激性变为抑制性．

尽管有上述效应，但在小白鼠、大白鼠和人体上的实验已证明，钒络合物是惊人地无毒的．然而，假如摄入量大，像在钒矿工作的工人可能发生的那样，看来会发生代谢过程的广泛性抑制．一个可能的解释（Cantley 和 Aisen, 1979）似乎是，钒在通常的水溶液中有两个稳定的氧化态，依赖于 pH 的不同，钒（V）以简

单的钒酸离子 $[VO_4]^{3-}$ 或以一种聚合的形式存在。在弱还原剂存在下容易形成络合的氧钒基离子[钒(IV)];它含有键合到一个氧上的钒,给出 $[VO]^{2+}$ 离子,然后同多种其它配体形成5或6配位的络合物。据认为细胞膜上有一种依赖 NADH 的钒酸盐还原酶,它控制着钒(IV)的浓度。因此,细胞氧化还原状态或 pH 的改变,比饮食摄取量的少许变化对钒代谢有更大影响,但是也可能钒的缺乏或过量能引起身体正常控制机理的失效。

最近有人提出钒在狂燥-抑郁病的病理中起一定作用。已有报道,在此病中整个身体的水和电解质代谢发生变化,很可能是由于在此病患者中被观察到的 Na^+/K^+ ATP 酶活性增加所致。已发现这个活性与血浆钒有关;在狂燥-抑郁状态中,血浆钒浓度高,而在恢复到正常状态时,钒浓度降到正常值。不过,尽管已有这些观察,钒在组织中的生理作用的了解仍处在襁褓阶段。

6.3.2 铬

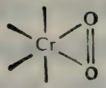
铬是正常碳水化合物代谢显然需要的一个必需元素,它同胰岛素代谢有密切关系。正常的铬营养水平可减少对胰岛素的需要,而饲以缺铬饮食的实验动物则出现生长障碍、寿命降低、血清胆固醇增高及有关的心血管疾病(Anderson, 1981)。许多这类症状在被认为缺铬的人身上也观察到,而且补充铬能消除症状。多数新鲜食物是铬的良好来源,并发现啤酒酵母是含量最高的食物之一,从其中分出一种铬的络合物,但还没有鉴定(Schwartz 和 Mertz, 1959)。已发现这个络合物能够使胰岛素的作用增强。

据认为活性铬络合物含有烟酸和谷胱甘肽或它的组分氨基酸,即甘氨酸、半胱氨酸和谷氨酸。已用谷胱甘肽制备了使胰岛素增效的铬络合物,但是,由于络合物在水溶液中离解,活性物种的精确性质又是未知的。这工作中问题的一部分在于生物液体中的铬含量的准确测定。在铬的分析中不锈钢设备的污染和某些技术问题只是最近才被克服。例如,在最近几年中,血清中铬的容许值由 1ppm 降到 1ppb 以下。对于这样低的浓度,络合物的分离和表

征是很困难的，多数成功的工作是依靠应用生物测定法监测生物功能。例如，正在应用一种在体外不同浓度铬存在下的胰岛素测定法来求铬的增效因数。

无机化学应用到这个问题上，至少能帮助确定发现的络合物的可能类型和可发生的一些反应。在正常条件下，带着像氨基酸类等多数配体时铬的稳定氧化态是 III。它是动力学和热力学上稳定的，并且在几乎所有形成的络合物中，金属铬都是 6 配位的。铬（III）能够被还原到铬（II），但这只是被络合到像氰化物、联吡啶基和硫氰酸盐等配体上，形成水溶性和稳定的络合物时才行，因此假如是被烟酸和氨基酸络合，就不大可能包括铬(III)-(II) 氧化还原体系．所以，在体内，同烟酸和谷胱甘肽这样些配体一道，6 配位的铬（III）络合物是最可能的类型。

有人提出，铬络合物的作用是作为胰岛素与含巯基的膜受体位点之间硫醇-二硫化物交换的催化剂。在体外，铬（III）取代反应的缓慢动力学可能使这不大可能，但是，在体内总是可能发生特殊的能量强化反应。然而，在生物学文献中没有被很多提到的另一类型的铬体系是含有双齿氧的一些物种。

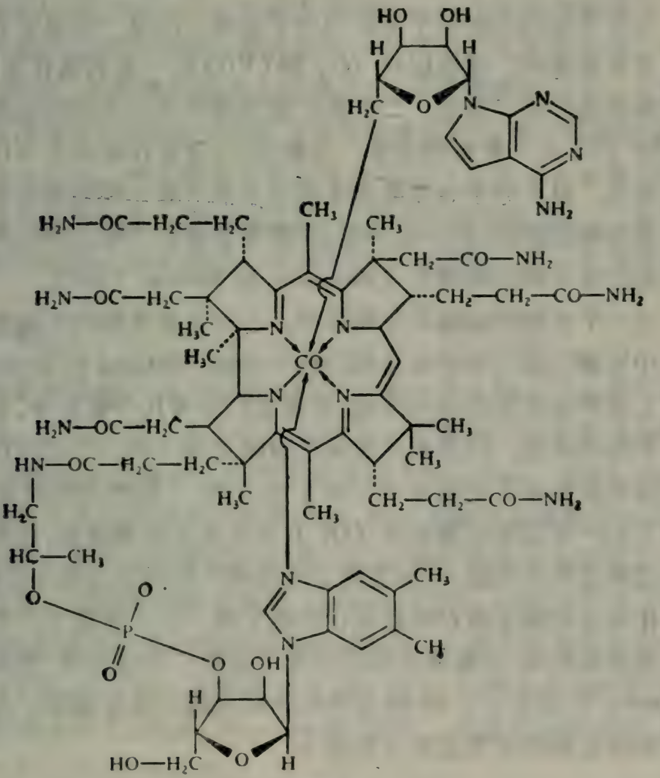


有相当多的铬化合物含有这个基团，例如 $K_2Cr(O_2)_2$，吡啶 $CrO(O_2)_2$，$(NH_3)_3Cr(O_2)_2$，$K_3[Cr(O_2)_2(CN)_3]$。这些络合物中铬在形式上的氧化态很可能是不确定的，同样地，[O—O] 基团也不能准确地被描述为过氧化物还是超氧化物离子。那么胰岛素结合到受体位点可能是通过由络合 [O—O] 的物种所催化的硫醇-二硫化物氧化作用。不过，虽然无机化学能帮助明确实验问题的本质，而铬作用的精确机理还有待于进一步的实验信息。

6.3.3 钴

虽然钴仅在为数有限的含金属的蛋白质中存在，而它在维生

素 B_{12} 中的作用，对于从微生物到人如此广泛范围的生命形式是不可缺少的(Wood 和 Brown, 1972)。在 2 价和 3 价状态，钴都能与含有氮给体的配体形成稳定络合物，而且据认为在维生素 B_{12} 的催化作用中，两种价态都被牵涉在内。钴在咕啉环系中被 4 个赤道氮原子络合。一个轴向位置被环系的侧链上一个给体原子占据。另一个轴向位置可以被像水、氰化物或碳链等多种多样的配体占据，因为维生素 B 酶的类型而不同。在维生素 B_{12} 分子中发现一个钴-碳键，在当时是未预料到的，而且对刺激制取金属有机钴络合物的研究产生了直接影响。



辅酶 B_{12}

与依赖维生素 B_{12} 的酶类相联系的两个主要催化反应是氢转

移和甲基转移．在前者，其机理一般包括氢被辅酶从底物夺取，然后发生底物的重排和氢回到它的新位置． 钴-碳键在与底物反应之前先断裂，在反应终点再形成．在后一类依赖维生素 B_{12} 的酶中，发生甲基转移，例子有乙酸和甲硫氨酸的合成；这些反应都以甲基化的咕啉衍生物为中间体．甲硫氨酸的合成是在鸟类、哺乳类及细菌中发现的一个例子． 其作用是把甲基从 *N*-甲基四氢叶酸转移到高半胱氨酸．这个酶的缺欠或失活被认为会助长恶性贫血的病状．

6.3.4 锰

生体内锰的化学似乎主要与分子氧或它的某一还原形式相联系．在水溶液中，锰能以从（II）到（VII）的一系列氧化态存在．其中最常见的是二价态，二价锰已被用来作为从含锌的金属酶中取代锌（II）的一种探测元素．在植物中，呼吸作用和光合作用链都包含锰．从水分子夺去电子生成分子氧涉及一种锰蛋白质，假如像某些细菌那样，缺少这种酶，那就需要像硫化物这样的外源性还原剂把电子供给到链中（Harrison 和 Hoare, 1980)．

另一个重要的锰酶是在细菌中，也时常在更精巧的细胞的线粒体中发现的超氧化物歧化酶(Michelson, McCord 和 Eridovich, 1977)．还不知道这些酶的结构，但是它们含有几个锰原子，其数目取决于酶的来源．同含铜的超氧化物歧化酶一样，它们的作用是保护组织免受超氧化物离子（O_2^-）的攻击． 但是在执行这个任务时它们产生过氧化物离子（O_2^{2-})，其本身又必须除去，推测是依靠邻近的过氧化物酶，例如谷胱甘肽过氧化物酶或过氧化氢酶．锰超氧化物歧化酶不是对抗超氧化物离子唯一的人体防卫，实际上前面提到过的铜-锌超氧化物歧化酶已被更广泛地研究．有趣的是在 Down 氏综合症中铜-锌超氧化物歧化酶的浓度增加，而锰超氧化物歧化酶的浓度反而有所减小．

6.3.5 锌

锌在溶液中主要以二价阳离子的形式存在．它出现在多种酶

中，还可能在 RNA 传递信息中被涉及。它的大小与 Cu(II) 相近，并且能在络合物的形成中与之竞争。但与 Cu(II) 不同，它不容易被还原。因此，它在酶中的作用看来是作为一个结构形成物和更重要地，在催化反应中作为路易斯酸。锌 (II) 是一个 d^{10} 离子，倾向于四面体或八面体几何形状。不过，在生物体系中有时发现锌 (II) 存在于为它的催化作用所必需的扭变四面体环境中 (Bertini, Luchinat 和 Scozzafa, 1982)。

羧肽酶中的锌离子 (Dunn, 1975) 处在蛋白质中的浅穴内，它同时能容纳作为底物的肽。这肽被如此取向，使羧基氧位于锌(II) 的配位圈中，锌 (II) 使羧基键极化，并且促进亲核进攻。在碳酸酐酶中出现配体键被极化的另一个例子，这里受影响的配体是水。底物二氧化碳与被极化的水反应，生成碳酸氢离子。在醇脱氢酶的化学中，一个类似的羰基极化是重要的 (第三和第四章)。

另一方面，锌在超氧化物歧化酶中的作用看来主要是在结构上。催化在铜位点上进行，而锌(II) 结合到脱辅基蛋白上，使酶采取特定的结构，结果使这一区域中的蛋白质较不容易被水接近。

6.3.6 钼

钼是独特的，因为它目前似乎是唯一的生物必需的第二排过渡金属。它存在于许多酶中，其中之一固氮酶已受到相当多的注意，因为低成本固氮有明显的经济效益 (Coughlan, 1980)。但是，在这些氧化还原反应中所涉及的钼，氧化态迄今还未被充分表征。

以氧化态形式的钼[(VI) 至 (II)] 能形成对空气稳定的络合物。但是，当钼氧间存在双键 (Mo═O) 时，虽然由于电子的离域，形式上氧化态的准确含义是成问题的，但很可能包含较高的氧化态 (VI) 或 (V)。在水溶液中，钼 (VI) 以单体的 MoO_4^{2-} 或以不同的聚合形式(包含 Mo—Mo 桥)存在。有硫化物存在时，形成 $[MoO_nS_{4-n}]^{2-}$ 型络合物。

在水溶液中，钼 (VI) 与多种以氧为给体的配体，如 β-羟基羧酸和糖类，形成络合物。另一方面，钼 (V) 与含硫醇基的配体，

如半胱氨酸或二硫代碳酸形成的络合物比较稳定. 许多钼(V)络合物是二聚的,带有桥接的氧或硫原子.在半胱氨酸配体和硫化物离子存在下,形成了带有桥接硫原子的钼(V)-半胱氨酸络合物.钼(IV)和(III)也能形成稳定的硫给体络合物. 钼(II)的络合物一般是强还原剂,但乙酸钼 $Mo_2(OAc)_4$ 是罕见的例外,它具有与乙酸铜(II)类似的桥接结构.

在没有确切证据情况下而假定了在固氮酶中钼离子是氮分子被络合和又直接还原为氨的位点. 这种固氮酶很重要,因为它提供了一个还原大气中氮为氨的主要途径,由此使氮可供植物,最终供动物利用. 这个酶由两种蛋白质部分组成,其中之一仅含铁,另一个既含铁又含钼.两部分蛋白质都对分子氧的氧化很敏感;进行需氧呼吸的固氮细菌通过多种手段防止它们的失活,一般包括氧的迅速代谢,或者有像对氧有很高亲合力的血红蛋白这样的蛋白质存在.

对于存在的钼的性质还有某些不明确处. 但是,最近 EXAFS 测定已指出,钼随同距离它 0.272±0.003nm (2.72±0.03 Å)的 2 个或 3 个铁原子被键合到距离它 0.236±0.002nm(2.36±0.02 Å)的 3 个或 4 个硫原子上 (Cramer 等, 1978). 也有证据指出距离它 0.249nm (2.49 Å) 有 1 个或 2 个硫原子. 但是, 要了解电子传递体系的机理还需要进一步的信息.

总之,关于生体内各个过渡金属的现有知识还不够,还不能构成它们生物活性的完整图象. 在有些情况,例如对铁、铜、钴或锌,已经作了相当大量的工作, 而且对特定酶位点, 如存在于维生素 B_{12} 和碳酸酐酶中的模型研究是广泛而有成效的. 在另一些情况,例如钒或铬, 甚至还要作许多工作才能表征体内过程所涉及的位点的性质.

6.4 主族元素: 钠、钾、镁和钙

如前面已提到的,这些主族离子在性质上是"硬酸",因此倾向

于与氧阴离子络合. 它们有强的电正性,并且不易被氧化或还原. 因此,在生物学上它们的主要作用是中和阴离子的电荷和保持天然液体的等渗压,因而在生命体系中需要量较大. 在化学上,Na^+ 和 K^+ 是类似的离子,Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 也是如此. 但是在生物化学上,离子半径的微小差别被放大了,并且导致不同阳离子的选择性的作用. 例如,K^+ 和 Mg^{2+} 被富集到细胞质中,而 Na^+ 和 Ca^{2+} 主要存在于血清中. 跨越细胞膜维持阳离子的浓度梯度要花费来自 ATP 水解的相当多的能量(Racker, 1979). 有效的分隔是重要的,因为 Na^+ 和 Ca^{2+} 离子迅速流入细胞常对一系列生物反应起到触发剂的作用.二价阳离子 Mg^{2+} 和 Ca^{2+}还参与一些酶、蛋白质和膜某种构象的稳定化. 为此,有效的分隔又是至关重要的. 例如,钙在细胞内的浓度是 $10^{-7}mol \cdot dm^{-3}$,而细胞外的浓度是 $10^{-3}mol \cdot dm^{-3}$. 在刺激作用中,Ca^{2+} 起第二信使的作用,对相应的细胞活动放大原始信号. 钙离子必须结合到蛋白质或酶上,它们再调制其它大分子的活性,这样在分子水平上起作用. 两个较重要的结合钙的蛋白质是钙调蛋白 (calmodulin) 和肌钙蛋白 C(troponin C) (Wasserman, 1977).前者分子量为 17000,含有四个用来结合 Ca^{2+} 离子的位点. 对于不同的反应,占据程度有变化. 还有贮存钙的蛋白质,如集钙蛋白 (calsequestrin),每个分子能结合多至 43 个的钙离子. Ca^{2+} 从这类贮存蛋白流出,可以在几毫秒内发生,以触发特定的反应. 然后,钙被 ATP 水解提供的能量泵回细胞之外. 虽然许多被钙调制的反应是相当专属性的,但有其它 2 价阳离子能干扰. 例如,Zn^{2+} 抑制血小板的凝聚和细胞吞噬作用,这两者都是需要 Ca^{2+} 离子的. 因此,生体内金属离子的全面平衡对于机体的正常功能相当重要. 最近已发展出一系列抑制钙调蛋白的药物 (Brewer 等, 1982). 它们显然是通过控制钙离子进入细胞,从而抑制 ATP 的合成和氧的吸收来起作用的. 因此,在体内主族元素有比过渡元素高的浓度,它们的环境时常是特殊和受到严密控制的. 从这些研究引起了生物化学和无机化学之间的协作,一个例子是如冠醚之类特异络合性配体的

不断发展.主要目标一直是得到具有适当大小的洞穴,接受某一离子优先于另一离子的配体，而更近期又研究氧以外其它络合基团的应用,以便改变位点的化学亲合力，而不仅是改变其洞穴大小.如在第四章中看到的,冠醚的有机化学也是广阔的领域.

6.5 用作药物的金属离子：金和锂

许多金属离子的化合物已被用作药物，钙、铁、钴或锌的一些化合物是首先的例子. 晚近对非必需金属离子的化合物产生了相当大的兴趣，铂化合物的应用前面已经提到. 在这里将讨论一个过渡金属金和一个主族金属锂的例子.

6.5.1 金

金是一个非必需元素,但它的代谢作用是有意义的,因为它的几个络合物在药物上找到了应用. 1961 年英国风湿病会议的报告中确认了含金药物在治疗风湿性关节炎中的有益作用. 此后含金药物有相当广泛的应用 (Shaw, 1979; Brown 和 Smith, 1980). 然而,还存在一些问题,因为有的病人完全没有响应，另一些人又有种种毒性副作用.尽管关于金疗法的临床方面有相当多的文献,但直到最近才试图明确金的作用机理. 最常用的金络合物是硫代苯酸金 (I) 钠 (myocrisin), 金 (I)-硫代葡萄糖 (solganol), 最近又有 s-2,3,4,6-四乙酰基-1-D-硫代葡萄糖 (三乙基膦)-金 (I) (金诺芬, auranofin) (图 6.3). 给药法为前两者肌肉注射,后者口服.

动物实验表明,在肌肉注射之后,金虽然在某些脏器如肝脏中有较大浓度,但遍及全身广泛分布.在金注射停止之后,长达 20 年之久，人体中还保持着可鉴定的量. 金的这种长期贮存引起了关于它的本性的问题. 实验证据提示，在某些细胞中发现的金聚集体很可能是金 (I)-硫型物种,从与体外金化学比较来看，这也似乎是最可能的络合物类型.

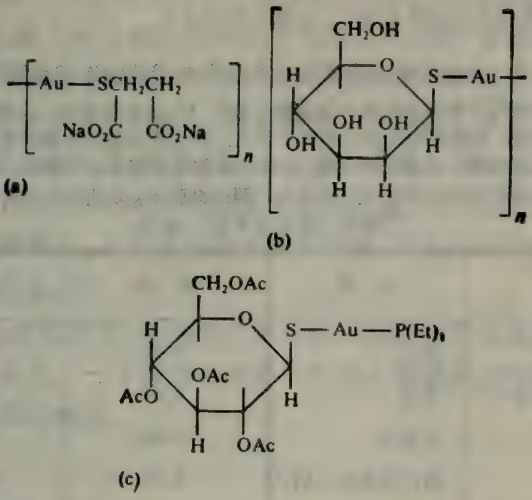


图 6.3 含金药物

(a) myocrisin; (b) solganol; 和 (c) auranofin. 它们都用于治疗风湿性关节炎. 据信在体内金与其它硫醇配体交换. 活性物种很可能是金而不是被释放的硫醇.

在水溶液中,金有两个稳定的氧化态,金 (III) 和金 (I). 前者可被"硬"配体,如氯化物或氢氧化物所稳定化,而后者则被"软"配体,如硫醇、氰化物和硫代硫酸盐等稳定化. 金 (III) 是相当强的氧化剂,在体内有机物质存在下不大可能长时间稳定. 因此,在体内最可能的含金物种是金(I),而最普通的配体是硫醇基. 其它天然存在的络合金 (I) 的配体是氰化物和硫代硫酸盐, 有某些证据指明,前者可能在体内起一定作用.

硫醇的作用看来在类风湿关节炎的病原学中有相当的重要性. 许多用来治疗此病的药物,或者本身就是硫醇(D-青霉胺),或者经代谢变为硫醇[左旋四咪唑 (levamisole),或硫唑嘌呤 (azothioprine)],或者能与硫醇反应(一些金的络合物,氯奎). 因此,不同的含金药物与体内天然存在的硫醇的反应性可能决定金的代谢产物, 并由此决定药物的效力. 硫代苹果酸金钠和金诺芬能给出不同的血液中金的分布,产生具有不同体内行为的金的形式,例如循

环中的金透过细胞膜的能力不同(表 6.3).

表 6.3 含金药物硫代苹果酸金钠和金诺芬的不同输运效应

注射硫代苹果酸金钠或口服金诺芬治疗 12 个星期之后，从每个病者采血，分离为细胞部分和血浆部分. 各部分与相对类型的空白对照一道培养. 再将试样分离，用原子吸收光谱测定金的浓度. 血浆中的金有不同的份量转移到空白对照的细胞中，表明血浆中有不同代谢物. 金浓度单位：μg/m.

细 胞	血 浆	细 胞	血 浆
金诺芬	空白	0.72	0.0
硫代苹果酸金钠	空白	0.28	0.0
空白	金诺芬	0.68	0.05
空白	硫代苹果酸金钠	0.05	3.0

金 (I) 与包括半胱氨酸和谷胱甘肽在内的多种硫醇形成 1:1 络合物. 还不知道这些络合物的结构，但很可能是线型的，类似金(I)——硫代硫酸盐，带有桥接的硫. 在重金属中，金 (I) 是相当独特的，因为结构已有报道的化合物多数是线形的，这可能是由于金的“*p*”轨道对成键的贡献很小，两个键主要留下“*s*”特性，因而呈线形. 唯有当配体有比较弥散的“*p*”轨道，如像膦类那样时，才发生较多的杂化，得到 3 配位和 4 配位的金 (I) 络合物. 另一方面，像普通 d^8 金属离子一样，金 (III) 主要形成平面正方络合物. 如上面已提到的，金 (III) 是良好的氧化剂，能迅速氧化硫醇为二硫化物，金被还原为金 (I)，再被过量的硫醇以硫醇络合物的形式稳定化. 如果没有过量的硫醇，就形成金属态的金(0). 对于这一点，D-青霉胺(二甲基半胱氨酸)是一个有趣的例外. 与半胱氨酸相反，它能与金 (III) 形成稳定的络合物，其原因很可能是立体上的. 由于靠近硫给体原子的碳原子上两个甲基的限制. 在络合物中两个硫原子很可能相互处于反式位置，反之对于半胱氨酸则可能是顺式的，而两个相互处于顺式的硫原子可能容易被氧化为二硫化物. 由于许多硫醇在体内是立体上受限制的，不考虑

存在某些金（III）的平面正方硫醇络合物的可能性或许是不明智的。然而，金（I）对硫醇的亲合力如此之大，使得金在体内的广泛分布很可能反映硫醇的广泛分布。前面已提到的其它很可能的配体，即氰化物和硫代硫酸盐，在生物液体中存在的浓度比硫醇低得多。有某些证据表明，吸烟多的人血液中的氰化物能增加细胞内面金的浓度，因而影响跨细胞膜金浓度的平衡。然而，关于金对氰化物或硫代硫酸盐，甚至还可能有硫氰酸盐，代谢作用的影响，迄今没有发表什么工作。

因此，总的说来，金的治疗效果很可能是由于以硫醇为主要靶垛的多种反应。一个很可能的金的作用点似乎是在细胞膜上具结构重要性的硫醇基。

6.5.2 锂

锂，碱金属中最轻的一个，据目前所知对人体不是一个必需元素。但是已发现碳酸锂对治疗狂燥-抑郁性精神病有效（Johnson, 1980）。据认为，它起作用是通过与一些普通的金属离子相竞争，并且由于它的络合物不同的稳定性，改变一些现存的反应途径。这就引起了一个问题——它最可能同什么金属离子竞争呢？在水溶液中，锂以水合的 Li^+ 阳离子的形式存在，并有与 Na^+ 和 K^+ 离子相同的电荷。但是，它比这两个一价离子小，约与 Mg^{2+} 离子大小相同。用另一种比较标准，它的表面电荷类似 Ca^{2+} 离子。因此，按照条件的不同，Li^+ 阳离子可以同 4 种普通的阳离子 Na^+, K^+, Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 中的任何一个相竞争。一个复杂的因素是锂离子在水溶液中是高度水合的，而这又影响它的络合能力。例如，已证明对某些离子交换树脂的结合强度次序是 $Li^+ < Na^+ < K^+$。因此，锂可以有多种的效应，其中某几个可能对同一生理体系有某种影响。

金属离子中，唯有锂能在体外循环中代替周围液体中的钠离子，在有效的时间内维持离体神经细胞的静止电位和动作电位（Birch 和 Sadler, 1982）。静止电位主要由于跨神经细胞膜的钾

电位，而锂离子并不明显地干扰钾离子的输运，但是，动作电位与钠离子梯度有关，暗示锂离子可能通过钠通道输运．一般认为，锂离子以类似钠离子的方式进入细胞，但输运出来则慢得多，结果使细胞内外锂离子浓度在同一数量级．在更专属性的钠位点，例如在钠泵中，锂不与钠竞争．因此，在动物试验中，加入锂离子不大影响血清中钠和钾离子的浓度．

锂离子似乎对各种过程都有影响，使得解释它的生物作用有些复杂化．例如，小白鼠注射锂离子后血清中镁和钙水平都增高．此外，在对酶的刺激作用中锂时常直接与钙和镁竞争．例如，锂能取代钙刺激乙酰胆碱的分泌．

6.6 现代物理方法

过去 20 年中，化学的发展已产生一系列可用于解决无机生物化学问题的有力技术．例如 X 射线技术已经改进到这样的地步，可以在大为缩短（虽然还是嫌长）的时间范围内阐明蛋白质中金属的周围环境．对于不能结晶的体系，可以用 X 射线吸收边界精细结构 （EXAFS）得出一些信息．但是，还需要关于像反应速度、溶液中的结构、改变微环境的效应等方面的信息，而为了达到这一点，化学家需要一系列能在实验时间范围内得出结果的技术．在这里只能提到这些技术的精萃，选作例子的是我们认为将对无机生物化学有越来越大影响的一些技术．

现代核磁共振仪是一种最好的设备，它能得到在无机生物化学中有直接价值的波谱．例如，能够容易地检测像 ^{23}Na 和 ^{95}Pt 这样一些核，自旋回波技术已被应用来鉴定完整细胞中像谷胱甘肽这样的可能配体的 ^{1}H 谱（图 6.4）（Isab 和 Rabenstein, 1979）．在像 Cu/Zn 超氧化物歧化酶这样一些酶中，金属离子蛋白质位点的 ^{1}H 和 ^{13}C 谱已成功地在 X 射线结构测定之先就预测了金属离子的环境，而又有如下固有优点：即不需要单晶和原则上能用来测定原位结构，或至少在模型研究时溶液中的结构等．

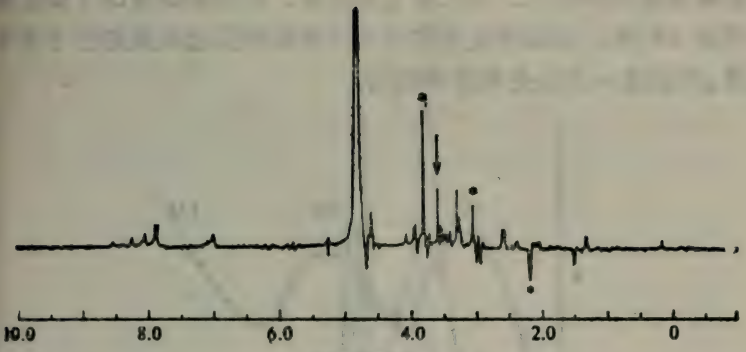


图 6.4 完整红细胞的自旋回波 NMR 谱
此技术利用小分子中与蛋白质中质子弛豫时间的差别得出小分子的相对较简单的谱图. 谷胱甘肽峰作了标记(*).

圆二色性 (CD) 可以用来确定像这样一些问题中蛋白质的构型，如镰刀形红细胞贫血病所引起的血红蛋白中 α 和 β 侧链的变化 (Woody, 1978). 手性的过渡金属络合物给出良好的 (CD)谱图，但良好谱图不限于这样一些络合物. 金属配体间的键是部分共价的，因而，如果配体上有手性中心，那末常常有足够的相互作用使金属上形式的 $d \rightarrow d$ 跃迁产生在容易达到的可见区中强的圆二色性. 例如，在六配位的氨基酸-铬 (III) 络合物中，两个配体场谱带

$$^4A_{2g} \rightarrow {}^4T_{2g}(^4F) \text{ 和 } {}^4A_{2g} \rightarrow {}^4T_{1g}(^4F)$$

出现在可见-红外光谱区. 在较低对称性的络合物，像与氨基酸配体的络合物中，这些谱带每个分裂为两个组分，它们在圆二色性中比在电子光谱中更容易鉴定(图 6.5).

拉曼光谱用于生物体系有能在水溶液中测定振动结构的优点. 但是它不太灵敏，为了得到足够的信号强度便于研究多数生物体系，需要很高级的设备. 拉曼技术的延伸，如相干反司托克斯拉曼光谱、受激拉曼或共振拉曼光谱克服了这个缺点. 其中现在最广泛应用的是激光共振拉曼光谱，它用波长与分子的吸收带相

同的激光束作激发光．与拉曼光谱比较，在顺利的情况下强度增加可达 10^5 倍，又因为此效应对电子结构能引起共振的分子有专属性，所以这一方法是有选择性的．

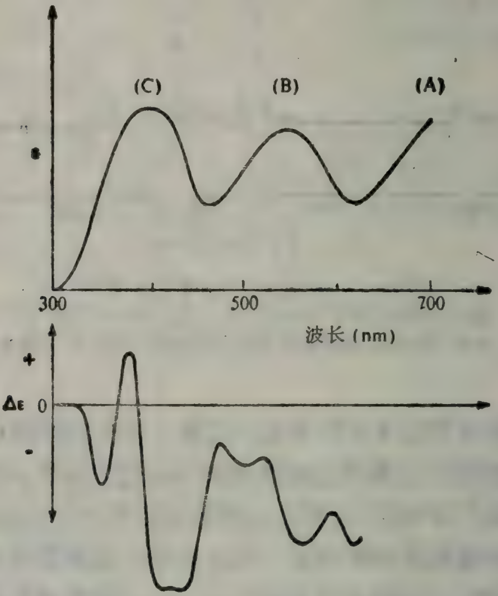


图 6.5　一种铬(III)-丝氨酸络合物的紫外-可见光谱和圆二色性，表明后一技术所能得到增高的分辨率

紫外-可见峰由于 $d \to d$ 跃迁：(A) $^4A_{2g} \longrightarrow {}^4T_{2g}$；(B) $^4A_{2g} \longrightarrow {}^4T_{1g}(^4F)$；(C) $^4A_{2g} \longrightarrow {}^4T_{1g}(^4F)$．*

一个应用此方法的例子是在血红蛋白存在下测定红细胞的溶胞产物中谷胱甘肽的浓度(约 2000μm) (Banford 等，1982) (图 6.6)．在用此法研究过的许多化合物中有几种含血红素的蛋白质、蓝铜蛋白、和视网膜色素类．

电子自旋共振在有利的情况下能对生物体系中的金属离子产生良好信号．例如，血清超滤液中的铜(血清铜的 1—5%) 和血浆铜蓝蛋白可以观察到，像高自旋、顺磁性的血红蛋白那样 (图 6.7)

* 原书有误，已更正．译者注

图 6.6 用 5,5-二硫双(2-硝基苯甲酸)(ESSE) 处理的溶血产物所得出的拉曼信号

振动是由血红蛋白和由 ESSE 与细胞内的硫醇反应生成的有色 $ES^{(-)}$ 离子产生的. 两者的电子光谱相重叠，但此处所示振动光谱是分开的，而且信号增强，以致能在生物体系中，10^{-5} 至 10^{-6}mol/L 的浓度下观察到.

A. 血红蛋白; B. ESSE; C. $ES^{(-)}$.

(Peisach, 等,1971).

这一技术的主要问题是线宽对所用金属离子及其环境很敏感.例如,在血浆铜蓝蛋白中多量铜是铜(II),因此应当能被检测到,但它却是"无声的",由于交换作用的结果不出信号.因此,虽然ESR 已成为有用而灵敏的探测器,但所得结果必须审慎地解释.

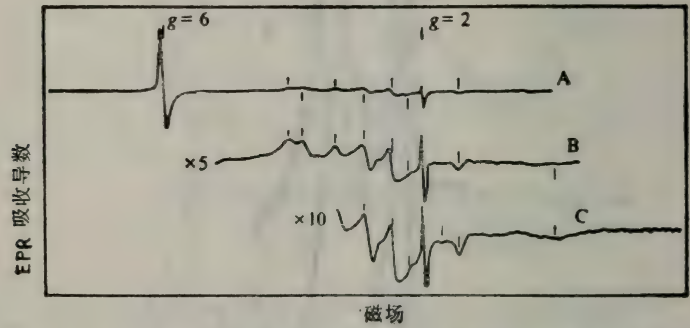


图 6.7 压实的红细胞中血红蛋白的这些 EPR 谱说明 EPR 谱应用于鉴定氧化态和密切相关的一些物种

这些红细胞已经同硝酸盐一起培养,以产生由于高自旋正铁血红蛋白的显著信号(A)及多种低自旋形式(B 和 C). 顺磁性血红素总量是存在的血红素的约 5%.

最后,研究金属离子的一个有利之点是可以用已变得迅速、可靠和半常规的一些技术在很稀的溶液中分析它们,使得能够进行相当精确的药物动力学实验. 或许中子活化分析是最可靠的方法,而能够用电镜绘制金属离子分布图给人最深刻的印象,但是原子吸收分光光度计简单易得使之成为最广泛应用的技术.图 6.8表示此法应用的一例,它被用来研究豚鼠口服氧化亚铜后的吸收.结合电泳和原子吸收光谱可以证明,铜的最大部分起初在白蛋白中,稍后则结合到血浆铜蓝蛋白上.

6.7 结 束 语

作者希望本章已经表明,虽然生物化学起初是有机化学的一

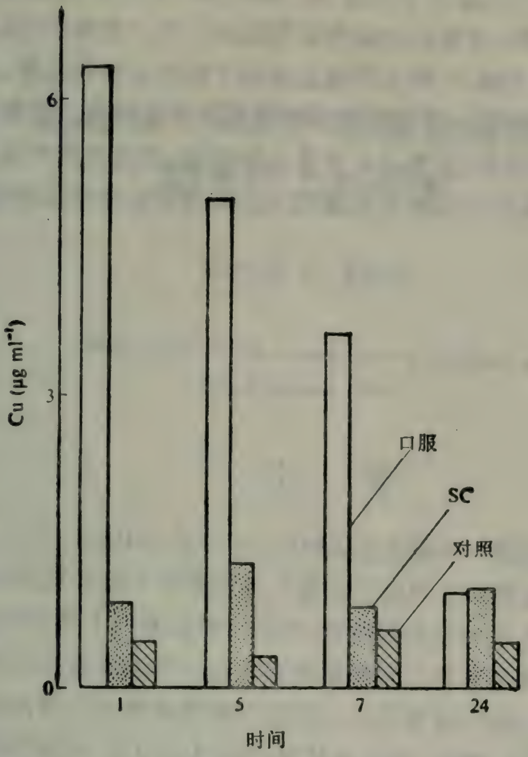


图 6.8 豚鼠口服 Cu_2O 后吸收的药物动力学研究，表明用原子吸收法分析可能达到的容易程度(SC，皮下注射)

试料稀释 10 倍，取样后几小时之内注入燃烧室，因而减少延迟和样品操持中的污染，这二点是这类分析中最重要的误差原因.

个应用领域，但新近的发展已指出，金属离子化学也在其中有很大一部分贡献，而且随着我们知识的增加，这部分作用还将扩大. 由于许多生物化学家对过渡金属化学学习得很少，已经使一些无机化学家进入这一领域. 他们的贡献主要是阐明某些酶中特定金属离子的环境和反应，以及相伴随的一系列模型体系的提出. 就某种意义来说，这是传统过渡金属络合物化学的一个逻辑步骤，很可能应用同样一些原理，只不过在较为复杂的环境而已.

与此平行前进的是生体内的化学、吸收、输运和一般代谢作用

的研究，这些正是本章的重点．这种工作包括更边缘交叉学科性质的研究途径，特别是在也考察“健康时”和“疾病中”诸变量的时候．不可避免地，这种工作远远落后于比较正统的化学，但终究将成为最有报偿的．这种研究的部分推动力也来自目前对某些金属污染危害的认识，虽然还有许多工作要做，但是我们对前景充满希望，对一些生物过程新的和激动人心的透彻的理解即将到来．

第七章　天然产物生物合成在酶水平上的研究

David E. Cane

(Department of Chemistry, Brown University, Rhode Island, USA)

7.1 引　　言

自 J. N. Collie (Collie, 1893) 首先提出一些简单的含羰基化合物的反应与众多芳香植物代谢物的结构之间存在联系以来，已经过去 90 年了. 在这些年代中，生原理论已经扩充和成熟，使得现今至少在原则上可以合理解释浩瀚的大多数天然有机物质的来源. 放射性同位素示踪物的应用，以及更新的稳定同位素核磁共振方法的革新，对中心代谢的简单化合物，乙酸、氨基酸和碳水化物等与似乎无穷无尽的多种多样有机天然产物之间，被广泛接受的前体-产物关系提供了坚实的实验基础. 过去几年中，天然产物生物合成研究已进入一个新的非常激动人心的时期. 在多年几乎完全用完整细胞或整个机体进行工作之后，越来越多的研究工作者已开始把注意力转向次级代谢途径中的单个的酶. 这种发展进行得那么迅速，甚至已经不可能概述所有的为数众多的例子，只能摘要地介绍最近报告的并且对我们了解天然产物来源有意义的酶水平的研究. 然而，考察这工作的某些动机，探讨它的优缺点和反映它在生物有机化学将来发展的前景还是可能的.

看来相当奇怪，主要对象一直是揭示大自然进行有机化学的方式的一个学科，却花了许多年才把注意力转向大自然的主要作

用物,即酶身上. 事实上,许多生物合成问题历史上已在酶水平上进行过研究. 在本世纪 50 和 60 年代进行的甾体生物合成经典研究中 (Bloch, 1952; Popjak 和 Cornforth, 1960, 1966; Clayton, 1965; Cornforth, 1973), 使我们详细了解了乙酰辅酶 A 经由关键中间体甲瓦龙酸和鲨烯转变为胆甾醇的错综路线. 这个路线的多数酶已经被表征,有些以结晶体的形式,另一些还只是粗制品; 这些划时期的研究结果,已被当作实验上和观念上的标准或试金石,用来评判还不十分明确的萜类体系的众多研究. 卟啉生物合成途径的主要轮廓从开头就是在酶水平上明确的(Bogorad,1966;Burnham, 1969), 而关于惊人地丰富的花生四烯酸系列的更近期工作, 主要依靠了酶学研究 (Samuelsson 等, 1978; Samuelsson, 1981). 另一方面, 多酮衍生物 (polyketides)、萜类和生物碱等生物合成的酶学还仅处在相对的幼稚期, 尽管事实上这几类化合物不仅是早期生源学思想的焦点, 也一直是生物合成研究的传统中心.

在每一种情况下, 属于这三大类代谢物的一些化合物的生物合成, 已进行的研究主要是将同位素标记的前体馈饲生长细胞或原状的组织,随后分离产生的标记代谢物,再作适当分析, 用降解法或波谱法,测定标记部位 (Brown, 1972). 这类型的掺入实验,其中有许多达到了灵活精致和完好的顶峰, 不仅导致了各个多酮衍生物、萜类和生物碱主要前体的鉴定,也使得有可能对简单前体转变为较复杂的天然产物的一些很可能的途径作出合理的推论. 指导设计和解释这些掺入实验,已有为数不多的中心假设,它们形成生原理论的核心, 并被认为归纳了碳-碳键和碳-杂原子键形成的主要机理. 例如, 环状多酮衍生物被认为是来自线形 β-多羰基链,经简单的醇醛缩合环化, 继之以适当的脱水和还原 [图 7.1(a)]. 同样, 环萜类被认为是从一小类开链前体通过一系列对双键的分子内亲电加成,随后经适当的去质子化、再质子化、氢负离子转移和 Wagner-Meerwein 重排等得来的 [图 7.1(b)]. 生物碱的特征分子骨架常常能从适当的亲核的烯醇或芳香双键与亚胺阳

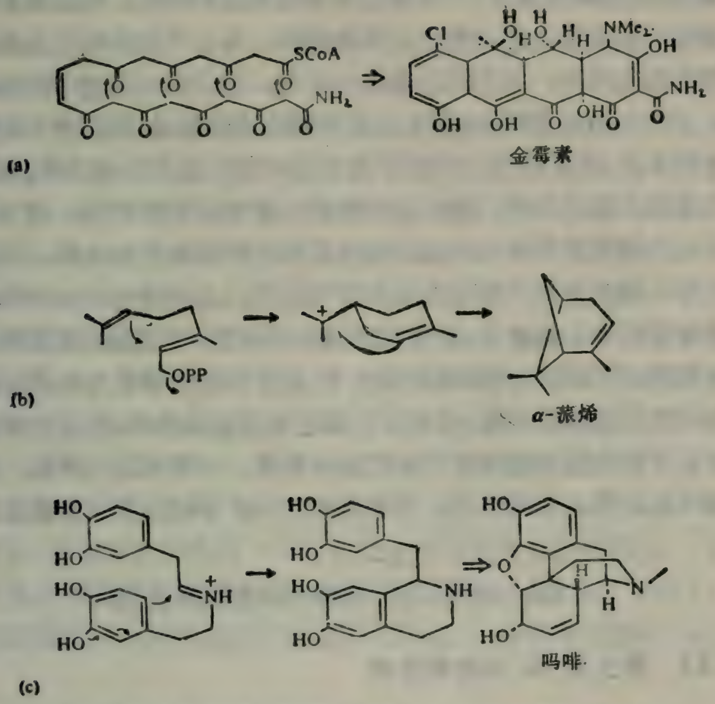


图 7.1 多酮衍生物、萜类和生物碱环化原型

(a) 线形十酮衍生物到金霉素的转化；(b) 牻牛儿基焦磷酸酯环化为 α-蒎烯；(c) 由 Schiff 碱生成吗啡.

离子发生 Mannich 型反应得来，亚胺阳离子本身是由胺与羰基简单缩合产生的[图 7.1(c)]. 这些中心规律在预见和合理解释如此大量的实验结果上取得的巨大成功，连同这些范例所启发出来的众多仿生式模型的合成，使得对这些生原假说的基本正确性不容置疑. 然而，仅仅在最近几年内，当次级代谢作用的一些酶受到实验检查时，生物合成研究者才开始直接碰到处于生原理论中心位置的关键的生物合成问题.

如果我们简略地考察一下生物合成研究工作者被迫用来工作的实验体系的性质，在酶水平研究的潜在优点是显而易见的. 某种前体，不论是乙酸、甲瓦龙酸或氨基酸，转变为远隔的多酮衍生物、

萜类、或生物碱等类产物，根据特定的完整的转化，可以提出一个包括一系列独立的化学中间体的途径，每个中间体被认为是某个特定酶的产物，又是第二个酶的底物。为了确定这些中间体沿变化途径上的实际顺序，已发展了种种结构判据，包括分离出候选化合物本身，和证明每一物质可作为这一途径终产物的前体，而且也可来自共同的前体。还必须满足进一步的动力学判据，例如要求来自共同前体的标记到达中间体必须在到达终产物之前，设想的中间体转变为终产物应当比初级前体快。由于潜在的中间体必须能穿越种种细胞壁障，以便从代谢中的细胞扩散出去，或者再进入细胞内，所以实验问题被复杂化了.对于没有足够长寿命以进行检测的高反应活性底物，或者对于缺乏主动输运体系，不能穿越正常情况下亲脂性细胞壁障的高度极性物质，问题就特别严重。无细胞体系的优点是明显的，三个近期的例子可以说明它的能力。

7.2 应用无细胞体系的最新进展

7.2.1 维生素 B_{12} 的生物合成

到 1974 年，Battersby 和 Scott 等实验室大量的 ^{13}C NMR 研究已经确定，氨基乙酰丙酸(amino levulinic acid) (*7.1*)、胆色素原 (porphobilinogen) (*7.2*) 和蛋氨酸(*7.3*)是维生素 B_{12} (*7.5*)咕

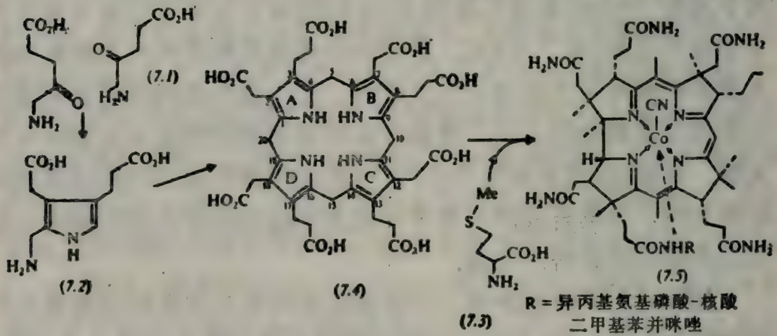


图 7.2 氨基乙酰丙酸(*7.1*)、胆色素原(*7.2*)和蛋氨酸 (*7.3*) 经由尿卟啉原 III(*7.4*) 转化为维生素 B_{12}(*7.5*)

啉环系的基本结构单元，而且有力地暗示，尿卟啉原 III (uroporphyrinogen III) (urogen III)(*7.4*)可能是卟啉族与咕啉族之间的关键环节(图 7.2) (Battersby 和 McDonald, 1975; Scott,1975). 尽管这一假说具有合理性，但试图通过馈饲给原状细胞的实验来证实假定的尿卟啉原 III 作用的许多企图都没有成功 (参见 Scott 等,1972). 从两种产生维生素 B_{12} 的微生物 *Propionibacterium shermanii* (Scott 等,1973;Battersby 等,1975)以及 *Clostridium tetanomorphum* (Dauner 和 Mueller, 1975),发展出一种具活力的无细胞制剂，不仅毫不含糊地证明尿卟啉原 III 可以转化为咕啉环系，而且最终导致在这一转化中几种关键中间体的分离和鉴定. 这些新被认识的代谢物中，第一个是邻环四氢卟啉(sirohydrochlorin)(因子 II), 已证明它有(*7.7*)的结构 (图 7.3), A 和 B 环都含有甲基(Deeg 等,1977; Scott 等, 1978; Battersby 等, 1978). 随后又有另外两个甲基化的尿卟啉原被分离和鉴定. 因子 I 是单甲基衍生物(*7.6*)(Mueller 等,1979 a), 而因子 III (*7.8*)被证明带有三个附加的来自蛋氨酸的甲基，A 环和 B 环各有一个，

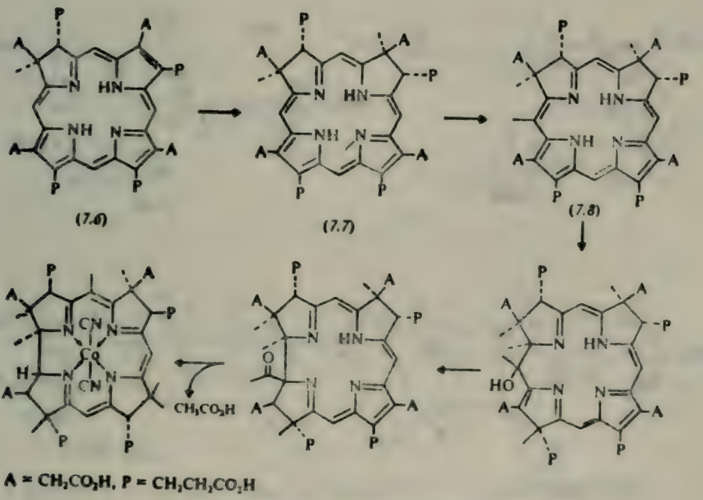
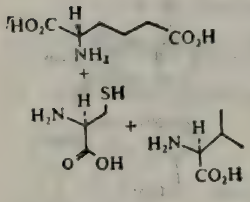


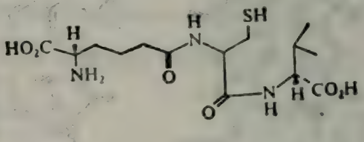
图 7.3 因子 I,II 和 III 转化为钴啉酸

第三个很意外地在 C-20 上，它一定是在随后形成咕啉的环收缩中失去的（Mueller 等,1979 a,b; Battersly 等,1979; Lewis 等，1979）. 苏黎世（Mombelli, 1981）和牛津（Battersby 等，1981）的研究组最近证明，C-20 和它新得到的伴随甲基完全以乙酸 的形式被排挤出去,导致提出一个新的高度合理的、以经典的半苯耦因缩合为基础的咕啉环收缩机理(图 7.3)（Rasetti 等,1981）. 随后，用越来越高度精制的酶制剂进行的工作，确定了在它们的酶转变中，因子 I 和 II 的实际氧化态分别是相应的四氢和二氢衍生物（Mueller 等，1979a; Battersby 等,1982）. 更近，Battersby 应用高场 NMR 和脉冲追踪技术，推定下一步甲基化发生在C-17 上（Uzar 和 Battersby, 1982）. 看来应用传统的馈饲整个细胞的方法进行这些研究是不行的.

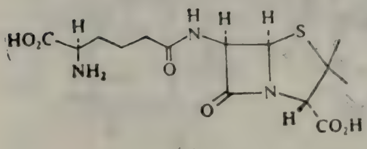
7.2.2 青霉素和头孢菌素的生物合成

表明无细胞的酶-水平研究潜力的第二个例子取自极其重要的青霉素和头孢菌素这两类 β-内酰胺抗菌素的生物合成研究. 在

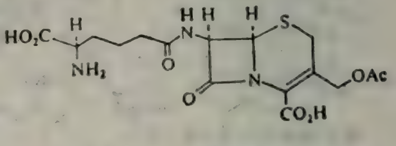




(7.11)



(7.9)



(7.10)

图 7.4 青霉素 N (7.9) 和头孢菌素 C (7.10) 的来源

这里又是先用放射性标记，后来用 [^{13}C] 标记的底物，过去的工作已明确地确定，缬氨酸、半胱氨酸、和 α-氨基己二酸等几种氨基酸是青霉素N (*7.9*) 和头孢菌素C (*7.10*) 的共同前体 (Aberhart, 1977; 图 7.4)。在这里也鉴定出了一个可能的中间体，它具有 Arnstein 三肽，即 δ-(L-α-氨基己二酰基)-L-半胱氨酰基-D-缬氨酸(*7.11*) [(LLD)-ACV] 的形式 (Arnstein 和 Morris, 1960)。然而，想要应用青霉 *Penicillium chrysogenum* 或者头孢菌 *Cephalosporium acremonium* 的培养来证明这个简单的三肽原样地并入青霉内酰胺 (penams) 或头孢内酰胺 (cephems) 的所有企图都没有成功。经过相当大的努力，这一问题终于解决了，是 Abraham 发现了 *C. acremonium* 的原生质经渗透溶胞作用所得出关键的环化酶具活力的无细胞制剂(Fawcett 等, 1976)能使三肽环化。β-内酰胺生物合成中的另一个谜也得到了解决，经过仔细分析，发现 (LLD)-ACV 环化的初产物是含有一个未重排的 L-α-氨基己二酰侧链的异青霉素N(O'Sullivan 等, 1979; Konomi 等, 1979)，而不是以前曾假定的差向异构的青霉素N(图 7.5)。尽管

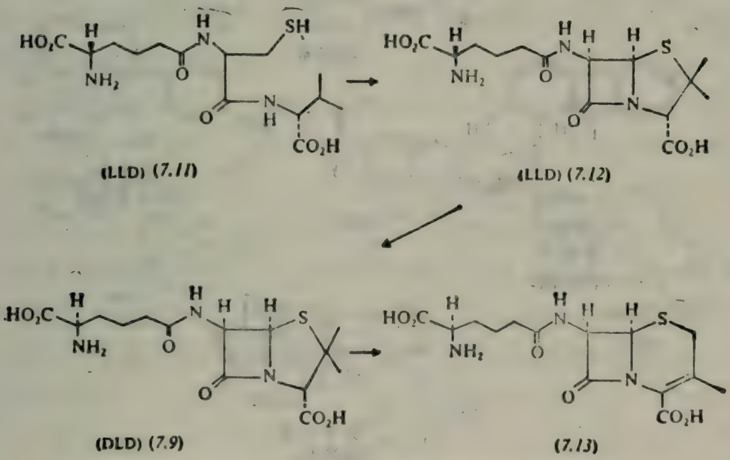


图 7.5 (LLD)-ACV 环化为异青霉素 N (*7.12*)和青霉素N 氧化性扩环为脱乙酰氧头孢菌素(*7.13*)

有人声称分离得到了一个单环的 β-内酰胺中间体（Meeschaert，1980），但迄今所有其他想要在线形的三肽与双环的青霉内酰胺体系之间检查到别的中间体的企图，包括用 ^{13}C-NMR 的直接分析，都没有成功（Baldwin 等，1980 a）。事实上，还不知道 ACV 环化酶是由一个还是由更多的酶组成。进一步的工作(Baldwin 等，1980 b, 1981)证实了一个较早的说法(Kohsaka 和 Demain,1976)，即青霉素 N 能被 *C. acremonium* 的无细胞制剂转化为脱乙酰氧头孢菌素 C(*7.13*)，由此确定了长期猜想的青霉素与头孢菌素两类抗菌素之间的直接桥梁。

7.2.3 吲哚生物碱的生物合成

第三个应用无细胞体系作出贡献的例子来自吲哚生物碱的生物合成这个领域.60 年代中期，在确立类烷戊环(cyclopen-tanoid)单萜的马钱素（loganin）(*7.14*) 作为柯楠西（corynanthé），白坚

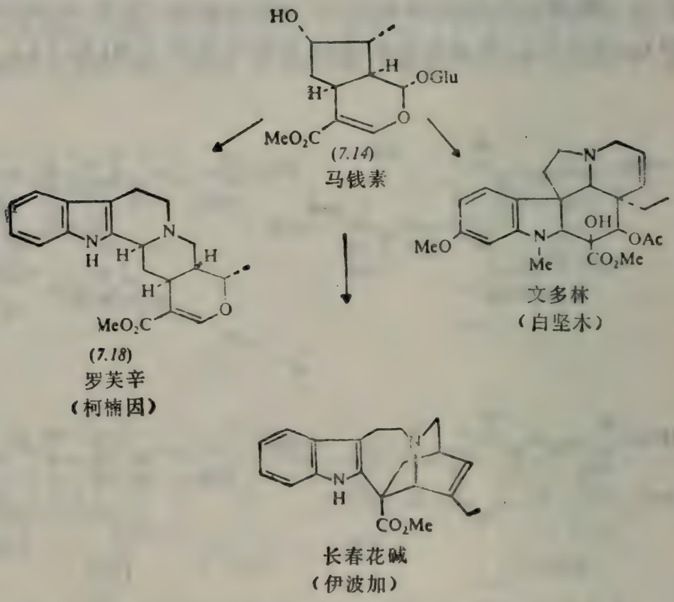


图 7.6 由马钱素衍生的吲哚生物碱

木（aspidosperma）和伊波加（iboga）等生物碱长期寻找的十碳非氨基酸前体方面取得了迅速进展(图 7.6)（Battersby 等,1969, 1968a,b; Brechbueler-Bader, 1968; Loew 和 Arigoni, 1968),用长春花和其它一些产生吲哚生物碱的植物进行的大量分离和馈饲实验，对于从马钱素变到一些主要吲哚生物碱的转化提出了言之成理的一系列中间体（Battersby, 1967, 1971; Scott, 1970)。但是,一个特别费解的问题是，难以解释何以是文柯碱（vincoside）(*7.16*)，即色胺与裂环马钱素（secologanin）（*7.15*）缩合产物的 3β-差向异构体（Blackstock 等，1971)，而不是其 3α-差向异构体异文柯碱（isovincoside)(*7.17*)[又名笔直西丁（strictosidine)]（DeSilva 等,1971),能够不失去 C-3 上的氢而转化为各种吲哚生物碱（Battersby 等，1968c, 1969; Battersby 和 Gibson, 1971)，尽管这必须在此中心发生差向异构化。随后从长春花的组织培养分离出能介导生成萝芙辛（ajmalicine)(*7.18*）和有关的一些柯楠西（corynanthé）生物碱类的无细胞酶体系（Scott 和 Lee, 1975; Stoeckigt 等,1976),带来了令人惊讶而又可喜的发现，即较早的前体关系事实上有些颠倒,笔直西丁才是实际上的生物前体（Sto-

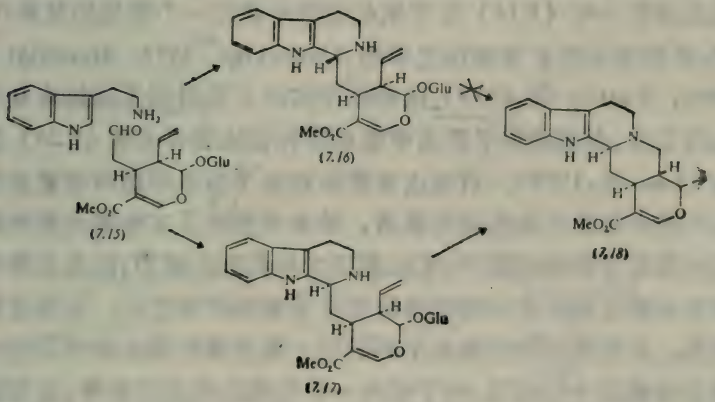


图 7.7　在生成萝芙辛(*7.18*)中异文柯碱(*7.17*)扮演的角色

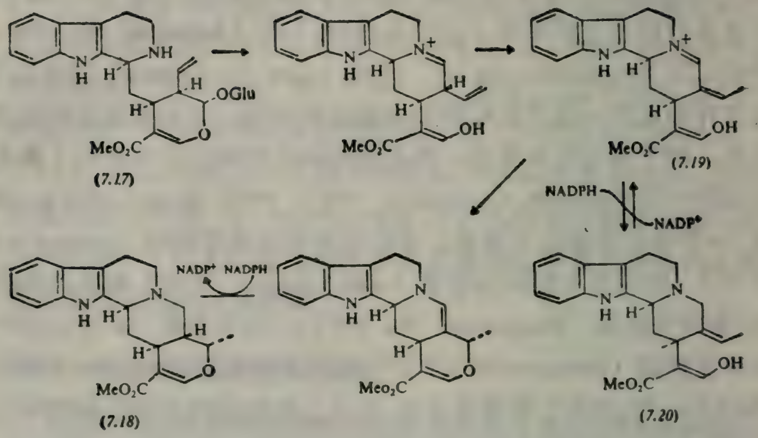


图 7.8 异文柯碱(*7.17*)经由脱氢缝籽木嗪(*7.19*)转化为萝芙辛(*7.18*)

eckigt 和 Zenk, 1977; Scott 等, 1977)(图 7.7). 不仅笔直西丁合成酶现在已经纯化大约 740 倍,达到了表观的均一性(Mizukami 等,1979),而且已明确地确定了引向萝芙辛的一些中间体的顺序(图 7.8). 值得注意的是,长久在争议中的缝籽木嗪(geissoschizine)(*7.20*)所扮演的角色,已由无细胞实验澄清,表明它是与脱氢缝籽木嗪(*7.19*)处于氧化还原平衡的一个明显的岔路代谢物,而后者是处于主途径之中的(Stoeckigt, 1978; Stoeckigt 等, 1980; Rueffer 等,1979).这些结论实际上也得到了同位素竞争实验的支持,由此确定了萝芙辛被色胺标记比缝籽木嗪(*7.20*)更快些(Lee 等,1979). 后面这些实验避免了整体细胞同位素竞争实验所固有的吸收和输运的混淆,着重地指明了在澄清代谢物顺序这种隐微难解的问题中,无细胞技术所具有的威力,这是在所有尚待解决的生物合成问题中传统的最困难的问题之一. 还将注意到的是,只有无细胞的酶水平的研究才能直接明确生物合成的一些转化对辅因子的需要,对于任何一个坚实的机理的解释,这方面知识是重要的.

7.2.4 多酮衍生物

借助于现代光谱、色谱、放射免疫等分析测试方法，像以上所举的三个例子清楚说明的那样，无细胞体系的应用提供了识别生物合成中间体的有力工具．这一技术作为在更加精细的水平上剖析生物合成中所发生转变的手段，其潜力还刚刚开始在探索．有可观数目的生物过程，特别是像多酮衍生物（polyketides）的构成和环化，被认为是在多酶体系的控制下进行的．从三个丙二酸单酰 CoA 单元和一个乙酰辅酶 A 启动体（starter）单元，生成甲基水杨酸(*7.21*)这样简单的一个代谢物，可能需要至少六个分立的步骤，每一步都导致暂时产生一个不同的基态有机分子．但是，因为这些中间体从来没有哪一个离开过多酶体系的活性位点，直接观察这些单个转化的任何一个都是复杂的，在所举例子的情况下，假定生长中的多酮衍生物链通过硫酯键由共价键拴系到酶体系上，与在脂肪酸合成酶中所发现的类似．实际上，甲基水杨酸合成酶至多是部分表征了的少数多酮衍生物合成酶之一（Scott 等，1974; Dimroth 等，1976)．我们对这一体系的了解，在很大程度上依赖于与已被充分研究的原核和真核细胞的脂肪酸合成酶相类比(Volpe 和 Vagelos, 1973; Bloch 和 Vance, 1977)．关于链

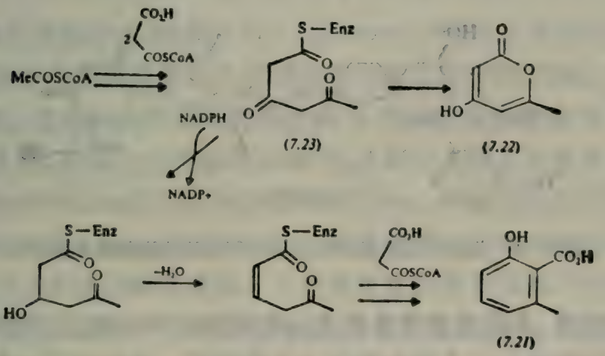


图 7.9 由乙酸到甲基水杨酸 (*7.21*) 的酶转化和出轨代谢物三乙酸内酯(*7.22*)的生成

$CH_3COSCoA, CH_3CH_2COSCoA, CH_3CH_2CH_2COSCoA$

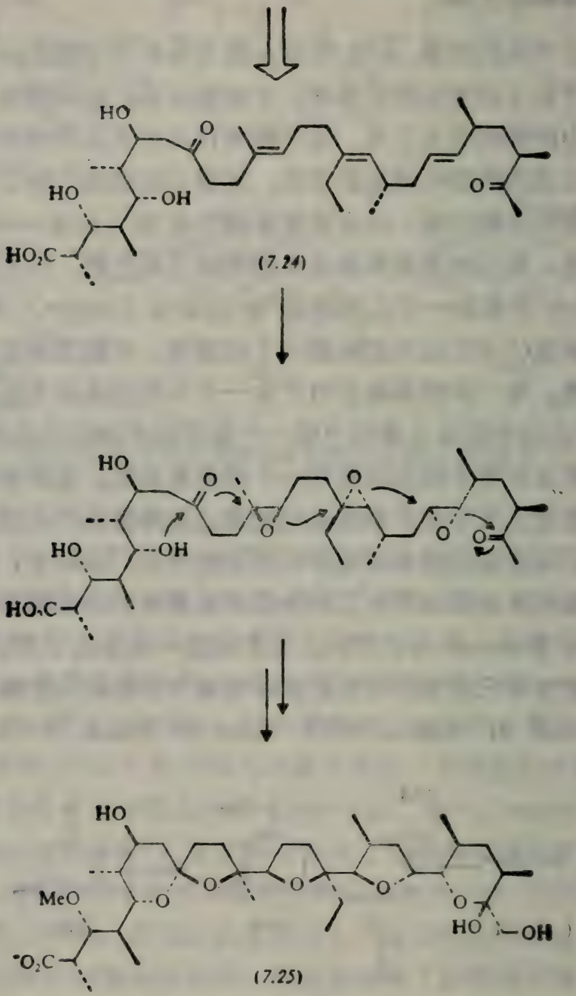
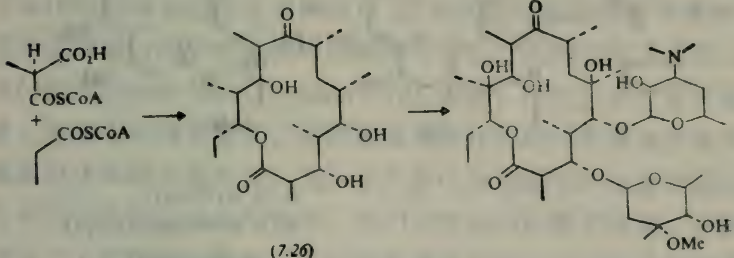


图 7.10 假定的由无环三烯(*7.24*)衍生的莫能菌素A(*7.25*)

构成的顺序,少数实验信息是来自对培养基中如省去 NADPH 就会导致出轨产物三乙酸内酯(*7.22*)的观察。这给出了一个合理但仍属暂定的结论,即二酮酯(*7.23*)的还原在与最后一个丙二酸单

元缩合之先(图 7.9)(Dimroth 等,1976).更复杂的多酮衍生物,如大环内酯和多醚类的生成，提出了复杂程度大过 10 倍的实验问题. 有人提出简单底物乙酸、丙酸、丁酸转化为三烯(*7.24*) 是抗球菌的多醚——莫能菌素(*7.25*)的前体(Cane 等,1981,1982a),这个转化可能需要最少 43 个不同的缩合、还原、脱水和还原等步骤(图 7.10). 目前还没有满意的实验模型描述在如此严格的位置控制和立体化学控制下，如此众多的各个步骤所依赖的酶体系的集合方式,和提示这么大的体系在实际上如何处理底物.在丙酸和甲基丙二酸转化为 6-脱氧赤酮酸内酯 B (6-deoxy-erythronolide B)(*7.26*)——大环内酯抗菌素类红霉素 A (*7.27*) 一个最早被确定的前体



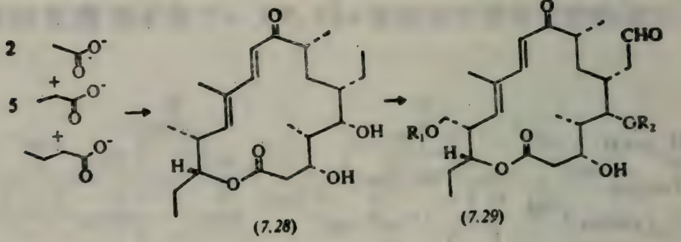
(*7.26*)

(*7.27*)

图 7.11 丙酸经由6-脱氧赤酮酸内酯 (*7.26*)转化为红霉素 A (*7.27*)

中,也遇到类似的问题(图 7.11) (Corcoran,1981). 虽然(*7.26*)到(*7.27*) 的转化包括的最后几步氧化和甲基化所依靠的酶已经被分离和表征,但多次企图观察无细胞的 6-脱氧赤酮酸内酯 B 的生成都遭到失败,实际上在甲基丙二酸与(*7.26*) 之间无论在原样的链丝菌的培养物还是衍生的破碎细胞制剂中，都从来没有观察到什么中间体. Corcoran 的悲观结论,说红霉素合成酶可能仅仅是适应底物压力的脂肪酸合成酶，几乎肯定是没有根据的. 分离适当的多酶体系仍旧是一个相当大的挑战,可能需要新的、更精微的破坏细胞和处理所得匀浆的方法. 研究多酶体系合成酶的一个特别有希望的途径，可能是应用现代 DNA 重组技术 (Sinsheimer,

1977; Wu, 1979) 来分离和放大适当的基因. 在几个研究室，包括 Baltz 的 (Baltz, 1978; Baltz 和 Seno, 1981,Baltz 等,1981), Hutchinson 的 (Wang 等,1982)和 Omura 的 (Omura 等,1981; Ikeda 等,1982), 已经对大环内酯生物合成的遗传学进行了工作(又见 Hopwood 和 Merrick, 1977). Baltz 报告了有趣的观察，在已失去产生 16 员大环内酯太乐菌素 (tylosin) (*7.29*) 能力的 75 个 *S. venezuelae* 的变种中,看来有 57 个在母体内酯体系原太乐内酯(*7.28*)的生成上受阻(图 7.12). Baltz 曾提出,这种特殊表现形式的高发生率表明，受影响的基因是为一种多酶的合成酶编



R_1 = mycinosyl
R_2 = 4'-*O*-(mycarosyl)-mycaminosyl

图 7.12 从乙酸、丙酸和丁酸经由原太乐内酯(*7.28*)衍生太乐菌素(*7.29*)

码的，当组分蛋白质之一有缺陷时这种合成酶就不能够装配起来. 与多酶合成酶的存在相一致的是,观察到原太乐内酯-阴性的一些变种都不能在共合成测定法 (co-synthesis assays) 中作为分泌体，这表明不存在任何可扩散的中间体. 这一领域中的进一步前进将要求发展适当的质粒或来自噬菌体的克隆载体，这个目标无疑将在几年内达到 (Chater 等,1982).

7.2.5 问题及前景*

虽然用无细胞体系工作为生物合成研究提供了重要的新机

* 有关生物化学的进一步讨论见第八章.

会，但也必须认识到，这一工具的常规应用受到许多严重问题的阻碍．多年来，次级代谢酶有非常难分离和处理的名声．这种传闻可以部分解释为什么化学家时常对于试图发展无细胞技术作为传统完整细胞馈饲技术的替换法表现出迟疑．此外，一些有经验的酶学家在取得具活性的合成青霉素的制剂时遇到的巨大困难，当然说不上有助于消除认为这种酶本来就不稳定，分离它们需要特殊技术的看法．但是，在多数情况，次级代谢酶的这些恶名很可能并不是它们所应得的．应用聚吡咯烷酮添加物中和可能有害的酚类物质，预先用盐水洗涤细胞以减少有害蛋白酶的滴度，用聚苯乙烯树脂除去内源性亲脂代谢物等等，在许多情况下缓解了比较常见的酶迅速失活或降解的问题．作为一个类群，次级代谢酶很可能并不比任何其它的酶更难以对付，或在细胞匀浆中遭到立即破坏．迄今已考察过的少数萜类环化酶是可溶的，大都有不太高的分子量(40 000—100 000)(Croteau, 1981;West, 1981)，它们肯定比许多在实验上有很高要求，却已被远为较好地研究的膜结合体系或糖蛋白体系较容易对付．实际上次级代谢酶提出的主要问题是完全不同，然而却同样严重的：它们在细胞中浓度不很高，所催化的反应不特别快．例如，我们后面将较详细讨论的冰片基焦磷酸(酯)合成酶，对于由牻牛儿(基)焦磷酸(酯)转化为冰片基焦磷酸，V_{max} 为 11.4nmol · mg^{-1} 蛋白质·h (Croteau 和 Karp, 1979)．在分子量 95 000 和假定此酶的最小纯度为 10％ 的基础上，可计算出周转数为催化底物10mol^{-1} · mol酶·h．像这样极平常的周转率，很可能对萜类环化酶是典型的，尽管能得到的数据还太少，不能据以作出可靠的判断．酶精制中一个被大家接受的教训是：在一系列精制的开始，对象酶的浓度越大，最后精制越容易．推到极端，在提供高度精制酶上，DNA 重组方法的成功就是基于生理滴度放大了二或三个数量级，使得随后的精制几乎成了微不足道的操作(例如，见 Schleif 和 Favreau,1982)．一些比较传统的选种方法通常只达到中等程度的提高，但也是基于同一选择性酶富化的原理．假如我们考察一下青霉素合成酶，可能对试图精制次级代谢酶的

研究工作者所面临困难的份量有所领会．商业用产生青霉素的微生物品系代表了为次级代谢活性而选种的极端，结果产率为每升培养物含 10—20g 或更多．但是，当假设终产物为最小周转，计算出约 5 天得 10g，相当于每小时仅 80mg 时，像上面那样的产率看来是比较平常的．换言之，每一升培养细胞中总的青霉素合成酶每秒给出稍少于 1μmol 的产物．这种计算很粗略，但很可能在一个数量级以内是合适的．然而，它们所揭示的是：分离粗青霉素合成酶的典型方法（O'Sullivan 等，1979；Meesschaert，1980）已经能收得细胞内所含全部酶的相当一部分，或许达到 10%．事实是 1L 微生物培养液每天能积蓄 2 克代谢物，尽管这可能给人以深刻印象，但还不能与 1L 含胞外蛋白酶的消化液能水解几千克底物相媲美！当我们不得不应用以低得多的水平，例如每升中 10—100mg，产生次级代谢物的培养物时，问题就更加严重．问题主要与低的周转数有关．多数酶分离方法以蛋白质的特性为基础；而另一方面，多数酶检测方法又以酶蛋白质对于某种底物的效应为基础．我们拥有酶的量越小，或者一定量的酶处理特征底物速度越慢，就必须先使检测这个酶的方法达到越低的限度．酶活性的这些限制是任何成功的酶精制规划必须克服的障碍．

选择用无细胞体系进行工作必须对付的另一个问题是许多最重要的生物合成途径的细节大体上还没有明确．显然，为了研究任何酶体系，我们应当至少知道酶催化反应本身的底物或产物，最好两者都知道． 稳定同位素 NMR 法最重要的贡献之一就是可以比较快地确定主要底物与产物的关系，至少能对联系前体和产物的途径的一般轮廓作出有见识的猜想．在某些情况，可能找到一些粗的无细胞制剂，能支持从初级前体到完全官能化的天然产物全部转变的顺序．这种情况时，有可能研究合成途径中越来越短的片段，直到单个代谢转变的焦点．但是，时常在粗的无细胞萃取物中缺少全部途径中的一个或多个酶，例如催化一些前体活化的，或促进后阶段氧化、甲基化或糖基化的那些酶．譬如，可以得到一种具活性的无细胞制剂，能催化焦磷酸法呢酯环化为某种倍

半萜烯，但不能将它转变为更熟知的氧化程度较高的代谢物. 在后一情况，手头有该倍半萜烯天然产物或人工合成的确证样品是有用的，或者必须建立检测和鉴定所产生物质小量样品的某种适当的分析技术.

毫无疑问，随着用次级代谢酶的工作取得经验，由于细胞破碎、蛋白质分离(包括一些亲合力方法) 以及底物测定等技术的改进,许多纯技术性的障碍将会得到克服. 如前面已提到的,基因克隆和放大的重组 DNA 方法，有希望大大增加用于研究的关键酶的量. 这一方法要能普遍地应用，首先必须克服在建立从真菌到高等植物的真核体系中转化作用和基因表达的适当方法中遇到的主要问题.然而,目前学术界和工业界研究室的分子遗传学家正在深入研究这些问题 (Hofschneider 和 Goebel, 1982),天然产物生物合成的研究肯定会从这一革命性领域的发展中得益不浅.

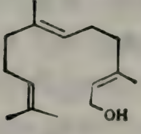
7.3 异戊二烯类生物合成的无细胞研究

前面的讨论对于 1982 年中期酶水平的生物合成研究的状况给出了一些概念. 当然,应当认识到,许多年来一些已被很好研究了的酶,例如醇脱氢酶、反丁烯二酸酶、苹果酸合成酶以及其它一些酶，已被应用为立体专属性标记的底物或降解产物合成或分析的有力工具 (Arigoni 和 Eliel, 1969; 又见第四章). 现在的讨论,有意地局限于考察这样一些研究,它们明显地涉及天然产物本身的生成所依赖的一些酶. 在后面一节中将较详细地叙述我们实验室关于萜类生物合成途径的一些酶的近期工作.

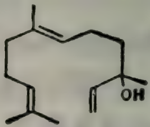
近几年来，我们一直研究多种细菌、真菌和高等植物体系产生的一些萜类代谢物的生物合成. 在多数情况下，这一工作的早期阶段是通过馈饲原样完整机体，再用传统的化学降解技术和现代波谱方法,包括高场 ^{13}C-NMR 和 ^{2}H-NMR，分析得到的标记代谢物这样一些方式进行研究的. 贯串这一工作的大部分，我们关注烯丙基焦磷酸酯类的代谢 (Cane, 1980). 这一类化合物在类

异戊二烯代谢物的生物合成中扮演着中心角色，研究它们的转化对于详细了解这一族化合物的生成机理是关键性的。我们在这一领域中更近期的工作，许多是在无细胞水平上进行的，在有些情况下用了近期文献中已有报道的酶，在另一些情况下则应用我们实验室发展出来的一些粗制剂。在研究的这一阶段，我们较少关心这些萜类代谢酶作为蛋白质或催化剂实体的性质，而较多关心在酶促转化过程中，尽可能严密地确定各个底物所发生的结构和成键上的变化。

自然界通常存在的烯丙基醇类：法呢醇（farnesol）(*7.30*)和橙花叔醇（nerolidol）(*7.31*)作为倍半萜代谢物的前体是大约 60 年前 Ruzika 首先提出的(Ruzika 和 Stoll, 1922)。在本世纪50年代早期，这个提法又从机理的角度归纳为“生原的异戊二烯规律”(Ruzika, 1959, 1963)，并且可以用来解释现已超过 200 的各个倍半萜烯碳骨架的形成（Hendrickson, 1959; Parker 等, 1967)。1958 年在研究甾醇生物合成过程中验明活化基团是焦磷酸酯（Lynen 等，1958，1959; Chayken 等，1958)。虽然通过馈饲整体植物或微生物培养，焦磷酸法呢酯本身，或者在某些情况游离的法呢醇，已被并入少数倍半萜烯代谢物中，但对这个关键的中间体所扮的角色，多数证据来自馈饲较早的前体，例如标记的乙酸、甲瓦龙酸，和分析衍生的标记代谢物中同位素分布所得结果(Cane, 1981)。尽管这些实验提供了丰富而有价值的信息，但是关键的环化反应的一些重要机理上的特点还是难以确定。最恼人的问题之一是认识到由反式烯丙基焦磷酸酯生成六员环要求前体的

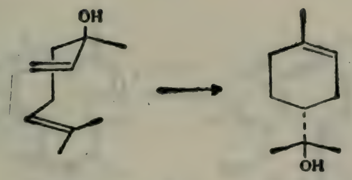


(*7.30*)



(*7.31*)

图 7.13 法呢醇(*7.30*)和橙花叔醇 (*7.31*)



(7.33) (7.34)

图 7.14 沉香醇环化为 α-松油醇

反式 2,3-双键异构化,以避免形成受过高应力的反式环己烯. 对这一概念上困难的认识,有助于解释最初生成的底物反,反-焦磷酸法呢酯(*7.32*)的异构化和环化而产生的两个相矛盾的理论. 第一个理论根据久已熟悉的沉香醇(linalool)(*7.33*)(一种烯丙基叔醇)能环化为 α-松油醇(α-terpineol)(*7.34*)(图 7.14)(Stephan, 1898),设想(*7.32*)首先发生烯丙基异构化或重排,成为橙花叔醇焦磷酸酯(*7.35*),它在迅速围绕新形成的 2,3-单键旋转之后,能发生顺利的环化(图 7.15). 双键异构化的另一个方式是从以下观察得到启发的,即由法呢醇衍生的法呢醛(*7.37*)在生理 pH 和温度下能发生迅速的顺-反异构,因此提出,反,反-焦磷酸法呢

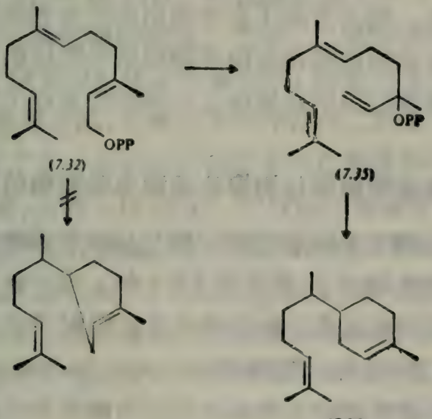


图 7.15 由焦磷酸法呢酯(*7.32*)首先异构化为橙花叔醇焦磷酸酯(*7.35*)再生成红没药烯基阳离子(*7.36*)

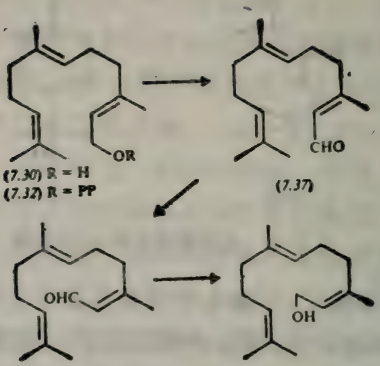


图 7.16 法呢醇异构化-环化的氧化还原模型

酯的环化可解释为焦磷酸酯先水解产生游离醇，随后氧化为法呢醛，同时失去一个 C-1 氢原子. 法呢醛发生异构化，然后还原和再焦磷酸化，就得到顺，反-焦磷酸法呢酯，它在几何形状上适于环化(图 7.16). 也曾提出类似的模式来解释从被认为万用前体的牻牛儿焦磷酸酯生成环状单萜. 支持这些理论的证据在 1980 年已作过综述 (Cane, 1980), 这里不再讨论. 注意一下最近三、四年内几个相互独立的实验室所进行的一些工作就够了，它们大多采用无细胞体系，完全排除了迄今提出的所有氧化还原机理，但与包括叔烯丙基异构体橙花叔醇焦磷酸酯中间体的另一路线完全一致. 下面介绍我们自己对解决这一问题的某些工作.

7.3.1 焦磷酸法呢酯转化为橙花叔醇焦磷酸酯的酶促异构化

虽然认识到焦磷酸法呢酯与橙花叔醇焦磷酸酯之间很可能存在联系已有相当时间了，但直到 1978 年，由于缺乏已知能催化烯丙基异构化反应的适当生物化学体系，限制了研究这一重要转化的机会. 我们发现由赤霉菌 *Gibberella fujikuroi* 得出一个无细胞体系，能够把焦磷酸法呢酯和橙花叔醇焦磷酸酯转化为环戊烷类代谢物环橙花二醇 (cyclonerodiol) (*7.38*) (Cane 和 Iyengar, 1978; Cane 等，1981b). 水分子加成到橙花叔醇焦磷酸酯的乙烯

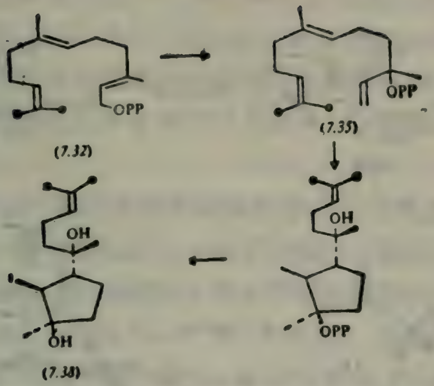


图 7.17 焦磷酸法呢酯转化为橙花叔醇焦磷酸酯并环化为橙花二醇(7.38)

基和中央双键的实际产物已弄清楚是相应的橙花二醇的焦磷酸酯，它再被另外的磷酸酶水解，断开 P—O 键，变为环橙花二醇本身(图 7.17)。应用 [12,13-$^{14}C_2$] 橙花叔醇焦磷酸酯作为底物，再降解生成的环橙花二醇，确定了所有标记都存在于侧链的烯丙甲基中，确证了环化的专属性。直接用 ^{13}C-NMR 监测相应于 C-1 和 C-2 的偶合双线（$J = 38.4$ Hz）可以观察到 [1，2-$^{13}C_2$] 橙花叔醇焦磷酸酯被部分精制酶所环化。此外，已证明环化酶对橙花叔醇焦磷酸酯的（3R)-对映体是专属性的，而培养（*E*)-[1,2-$^2H_2$，1-^{3}H]橙花叔醇焦磷酸酯，再测定所得环橙花二醇上标记的 C-1甲基的手性，确定了水分子加成到橙花基的乙烯基和中央双键时包含反，反立体化学，如图 7.18 所示。经过依次硫酸铵沉淀，Sephadex G-150 色层分离，和羟基磷灰石处理，可得到提纯约 10 倍而且不含磷酸化酶的酶制剂，用来进行竞争性培养，确定了橙花叔醇焦磷酸酯转化为环橙花二醇约比它的前体焦磷酸法呢酶快 5 倍。

无细胞体系也已被用来研究焦磷酸法呢酯到橙花叔醇焦磷酸酯这一转化本身(图 7.17)。[12,13-$^{14}C_2$] 焦磷酸法呢酯的短时间（15 min）培养得出了标记的橙花叔醇焦磷酸酯，在加入非活性的载体之后分离出来并降解，表明所有 ^{14}C 活性都在预期的位置

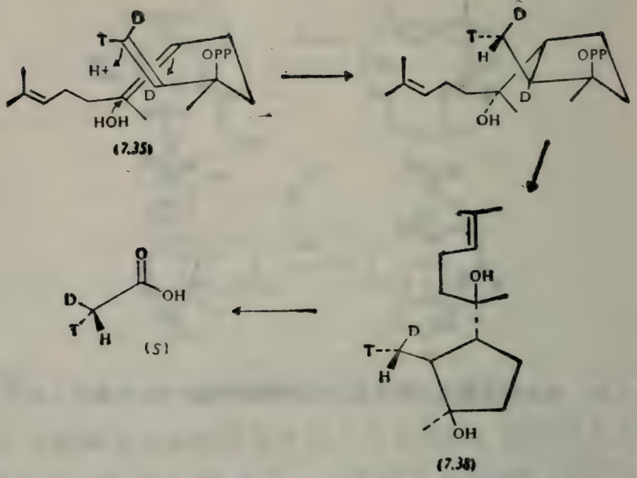


图 7.18 橙花叔醇焦磷酸酯环化为环橙花二醇的立体化学

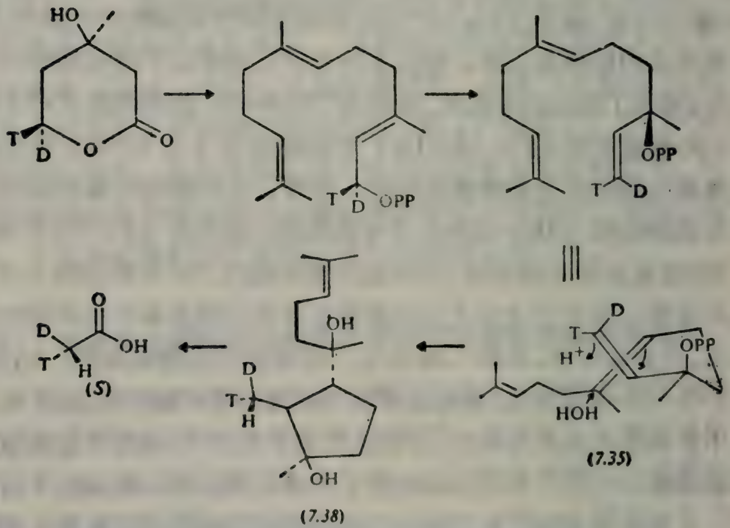


图 7.19 焦磷酸法呢酯转化为橙花叔醇焦磷酸酯的烯丙基异构化立体化学

C-12 和 C-13 上.记住由前述无细胞研究得到的关于橙花叔醇焦磷酸酯 C-1 上质子化的立体化学过程的知识,将立体特异性氚化

和氚化的甲瓦龙酸馈饲给 *G. fujikuroi* 的完整细胞，随后分析产生的环橙花二醇试样的手性甲基，可以毫不含糊地确定，焦磷酸法呢酯经酶促重排成为它的叔烯丙基异构体橙花叔醇焦磷酸酯，也不奇怪其完全按顺式立体化学进行（图 7.19）（Cane 等，1978，1981b）。

发现了法呢基-橙花叔醇焦磷酸酯重排在烯丙基体系的一个单面发生之后，我们的注意力转向了异构化过程中焦磷酸部分所起的作用，希望对一些断键和成键步骤的时序得到一些深入了解（Cane 和 Iyengar，1979；Cane 等，1981b）。在设计实验时，我们考虑了可能解释观察到的烯丙基重排四种理想化的机理（图 7.20）：A. 协同的磷-克莱森（Claisen）或离子跨越机理，其中，连接在近侧（近中心）磷原子上的两个对映的非桥氧原子之一，在产物叔烯丙基焦磷酸酯中连接到 C-3 上了； B. 一个被稳定化的

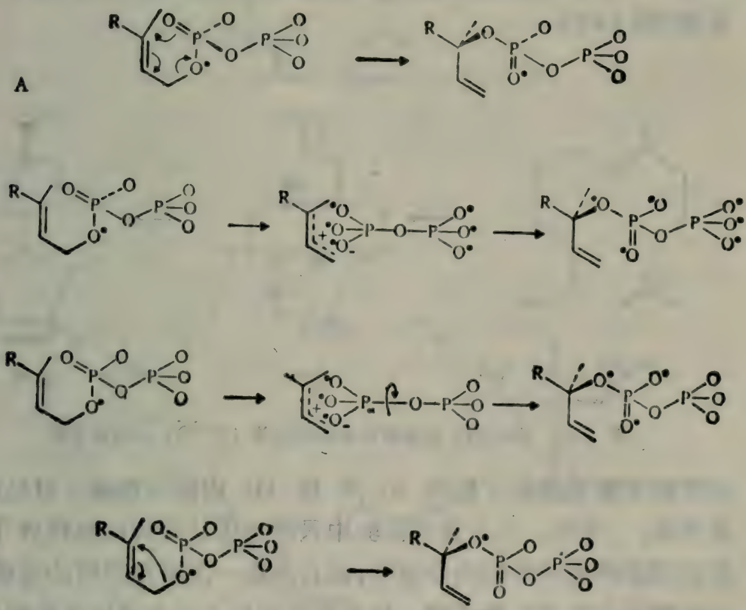
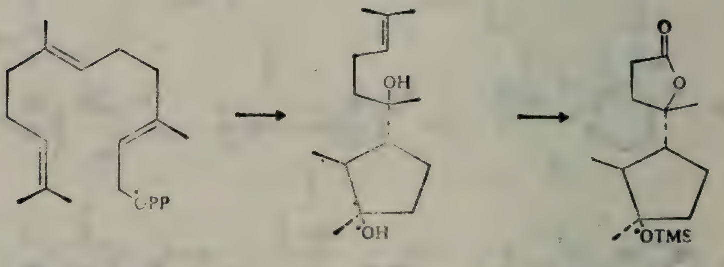


图 7.20 烯丙基焦磷酸酯重排假设的机理 A. 磷-克莱森重排；B. 游离焦磷酸酯；C. 紧密离子对；D. 1，3-重排.

烯丙基阳离子，或它的共价结合等当物，其中有游离无机焦磷酸生成，使得所有6个非桥氧原子都能完全搅窜（scrambling）；C. 离子对中间体，其中连接在近侧磷原子上的三个暂时等当的氧原子有足够时间平衡化；和D. 形式上的1,3-σ迁移重排，或紧密离子对，其中 P_{α}-OP 的旋转受限，使得原来酯的氧原子完全被烯丙基产物再捕获。用部分精制的由 *G. fujikuroi* 得到的酶制剂与[1-^{18}O]焦磷酸法呢酯一同培养，测定产物的 ^{18}O 含量，容易区别上述这些机理。应用这个酶体系时，我们利用了初始生成的橙花叔醇焦磷酸酯原位转化为无反应活性的终产物环橙花二醇的事实，前面我们已经指明，后者的 C-3 氧原子是与前者相应的 C-3 酯基氧原子等同的。

环橙花二醇的衍生物三甲基硅烷基内酯(*7.39*)的质谱分析证明，原来前体的 ^{18}O 仅有1/3存在于产物的 C-3 上，而控制实验又排除了前体预先搅窜，或因被内源的底物所稀释而降低 ^{18}O的富集度(图 7.21)。



(*7.38*) (*7.39*)

图 7.21 [1-^{18}O]焦磷酸法呢酯转化为[3-^{18}O]环橙花二醇

这些结果断然排除了机理 A，B 和 D，因此可按离子对机理C来理解。不过，已注意到实验中只测定了从异构化酶释放下来的橙花叔醇焦磷酸酯的净搅窜，没有测定一次单程周转的搅窜，也没有测定在释放产物之前，结合在活性位点的焦磷酸法呢酯与橙花叔醇焦磷酸酯互相转化的次数。像从下述焦磷酸冰片酯合成酶

的研究结果看到的，弄清楚活性位点平衡化的问题具有一定重要性，所以当我们知道怎样取得足够量的不含环橙花二醇焦磷酸酯合成酶的异构化酶时，我们计划要进一步考察烯丙基异构化.

7.3.2 焦磷酸法呢酯的异构化——环化．曲古二烯的生物合成

焦磷酸法呢酯变为橙花叔醇焦磷酸酯的酶促转化实验，提供了关于重排的立体化学过程，和导致所提离子对机理的关键断键和成键事件时间先后等等信息．事实上，离子对机理不仅可借以解释简单的烯丙基异构化，也可用来解释更复杂的形成六员环的异构化——环化（Cane 等,1981b）．接近我们关于焦磷酸法呢酯异构化酶工作的尾声时，我们开始考察了第二个首先由 Hanson报道的真菌酶体系，它能催化焦磷酸法呢酯环化为曲古二烯（tricho-

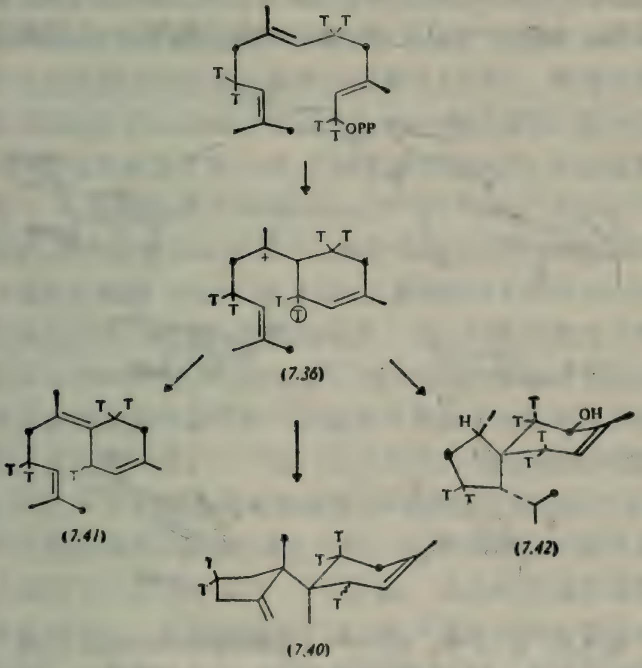


图 7.22　由共同的红没药烯基(7.36)中间体生成 γ-红没药烯(7.41)、曲古二烯(7.40)和胭脂虫醇(7.42)

diene）(*7.40*)（Evans 和 Hanson，1976），这是倍半萜抗菌素中曲古孢菌烷（trichothecane）族（Tamm 和 Breitensein，1980；Cane，1981）的母体烃（Nozoe 和 Machida，1972）。还已经报告，[1,5,9-$^{3}H_{6}$,4,8,12-$^{14}C_{3}$] 反,反-焦磷酸法呢酯（$^{3}H/^{14}C$ 原子比 = 6:3)与由曲古孢菌 *Trichothecium roseum* 得到的无细胞体系一同培养，得到曲古二烯，同时失去焦磷酸法呢酯的一个 C-1 氢原子(根据测得的 $^{3}H/^{14}C$ 原子比 = 5:3)(图 7.22)。这些发现似乎支持异构化-环化反应序列的氧化还原机理。可惜没有用适当的降解和测定同位素标记的分布来证实这一结论，也没有把底物和产物的适当衍生物重结晶到恒定的活性。有趣的是，较早 Overton 也有类似发现，他曾报告 [5-$^{3}H_{2}$，2-^{14}C] 甲瓦龙酸用从 *Andrographis paniculate* 组织培养得到的无细胞体系转化为（Z）-γ-红没药烯（*7.41*），结果氚标记损失 1/6，推测这相当于中间体 [1,5,9-$^{3}H_{6}$，4,8,12-$^{14}C_{3}$]反,反-焦磷酸法呢酯*C-1 上氢原子（T）

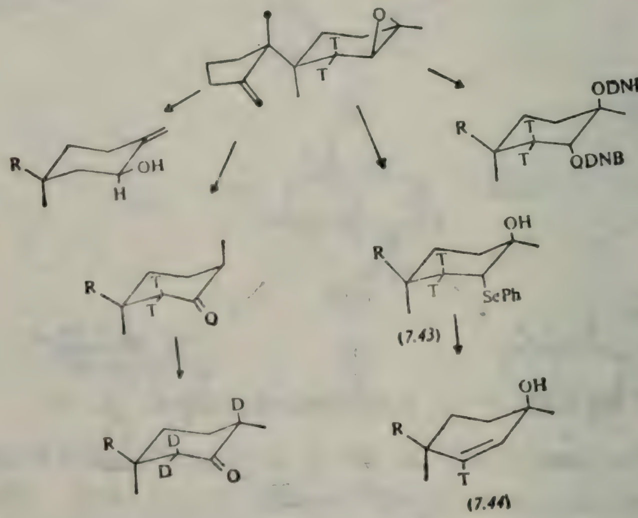
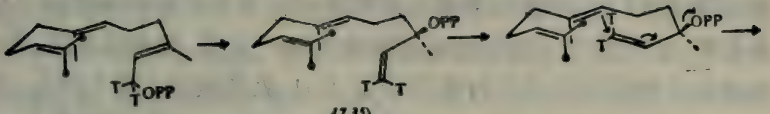


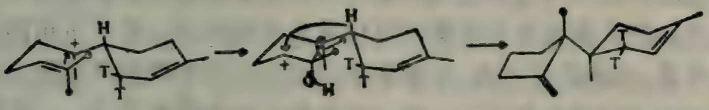
图 7.23 由 [1-$^{3}H_{1}$，12,13-$^{14}C_{2}$] 焦磷酸法呢酯衍生的曲古二烯

---

* 原文误为 $^{13}C_{6}$。译者注



(7.32)　　(7.35)



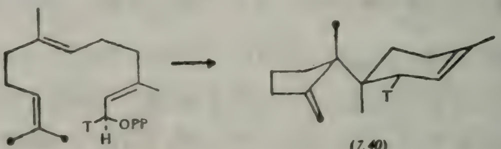
(7.36)　　(7.40)

图 7.24 焦磷酸法呢酯变到曲古二烯的异构化——环化机理

之一 (Overton 和 Picken, 1975; Mackie 和 Overton, 1977). 但很奇怪,曲古二烯合成酶似乎对除去焦磷酸法呢酯的 $1\text{-}H_{si}$ 具专属性,而红没药烯合成酶的作用却涉及 $1\text{-}H_{re}$ 的除去, 尽管推想两种环化包含同一中间体红没药基阳离子 (*7.36*). 使情况更加复杂的是,胭脂虫 *Fusidium coccineum* 的一种代谢物, 倍半萜胭脂醇(*7.42*)的完整细胞生物合成,已相当清楚地证明, 不包含焦磷酸法呢酯 C-1 氢的失去 (Gotfredsen, 1978; Cane, 1981).

因此,我们决定再考察曲古二烯合成酶的反应,希望对这一明显的矛盾作出解释 (Cane 等,1981c). 起初用 $[1\text{-}^3H_2, 12,13\text{-}^{14}C_2]$ 焦磷酸法呢酯作为底物小规模地培养, 揭示转化为曲古二烯的效率以及环化产物的 $^3H/^{14}C$ 之比都不受 NAD^+, NADH 和 NADPH 混合物存在与否的影响, 这一观察是与异构化的氧化还原机理相矛盾的. 更重要的是, $[1\text{-}^3H_2, 12, 13\text{-}^{14}C_2]$ 焦磷酸法呢酯 ($^3H/^{14}C$ 原子比 = 2:2)制备规模的培养,所得曲古二烯经图 7.23 所示一系列反应而降解,明确地确定了反, 反-焦磷酸法呢酯环化生成曲古二烯时不从前体的 C-1 上失去氢. 这些结果确实地排除任何氧化还原机理, 有力地倾向于包含叔丙烯基异构体橙花叔醇焦磷酸酯的另一种异构化——环化途径(图 7.24). 为了进一步试验这一模式,我们用 $(1S)\text{-}[1\text{-}^3H_2, 12,13\text{-}^{14}C_2]$ 焦磷酸法呢酯,又把

得出的曲古二烯经受一个类似的降解顺序，测定了环化的立体化学过程。从(*7.43*)衍生的硒氧化物顺式消除得到的烯丙基醇(*7.44*)不含氚，证明曲古二烯中氚标记完全处在α-位置，这意味着反，反-焦磷酸法呢酯发生环化时最后保留 C-1 处的构型(图 7.25)。此结果完全符合图 7.24 的机理以及前面已证明的法呢基-叔橙花基异构化的顺式立体化学。据认为，整个反应系列在酶的单一活性位点上进行，而现在已有条件直接试验橙花叔醇焦磷酸酯的中间体角色，并且测定它在关键的环化反应中的构型。有了可用的无细胞体系，也提供了机会，可试图利用适当设计的底物类似物，将原来隐蔽了的异构化反应从紧密偶联的环化步骤解偶联。实际



(*7.40*)

图 7.25 (1*S*)-[1-^3H, 12,13-$^{14}C_2$] 焦磷酸法呢酯转化为曲古二烯，保留 C-1 处的构型

上，被认为由曲古二烯合成酶所催化的转化包含着几个分别的成键和断键步骤，和至少一个基态中间体。转化的这种复杂性很可能对于一般烯丙基焦磷酸酯环化酶是典型的。将来应用这一类酶的研究中，一个主要的挑战将是设计一些方法来分解这种多步骤转变，以便能直接观察暂时产生的、在正常情况下从不脱离活性位点的一些中间体，以及寻找能探测酶促重排中产生的多种多样阳离子结构的方法。必须面对的最有兴趣的问题之一，是在催化共同底物焦磷酸法呢酯的反应(加速)，和控制在众多可能的产物中完全只生成单一的产物(专属性)二者之间，对这些酶的作用加以区别。虽然达到任何可靠结论还为时过早，但有趣的是，注意到了这些酶催化的反应虽然看来不特别快(周转数可以在 0.001 到 1.0 s^{-1} 之间)(参见 Laskovic 和 Poulter, 1981)，而底物的米氏常数是很不小的 (1—50μm)。同时，总体的机理图象已经变得比较一

致了，例如 Overton 用 [1-$^{3}H_2$,12,13-$^{14}C_2$] 焦磷酸法呢酯作为底物，再考察他当初关于红没药烯合成酶的一些实验，现在的结论是，在这一体系也同样，环化并不伴随从法呢基前体的 C-1 上失去同位素（Anastastis 等，1982）.

7.3.3 单萜的生物合成. 焦磷酸冰片酯合成酶

在进行以上研究的同时，美国华盛顿州立大学 Croteau 的研究组在与之密切相关的单萜生物合成的领域中取得了显著进展（Croteau, 1981）. 已知的单萜大多数是由高等植物产生的，多少年来，低掺入、区隔效应（compartmentalization effect）和无细胞制剂的迅速失活等相联系的问题，又被太常见的缺乏严格实验所加剧，结合在一起，对解释这类使人误认为简单的化合物的生成，产生了含糊论点和可疑假说. 最近几年来，Croteau 用已知能产生香精油的一小群植物作无细胞制剂工作，包括鼠尾蒿、薄荷、艾菊、小茴香等，对了解主要类别的单环和双环的单萜烯的生成作出了重要进展，这些萜烯包括 *p*-薄荷烷、蒎烷、冰片烷、小茴香烷（葑烷）和侧柏烷（苧烷）等类. 这些工作大部分已有综述（Croteau, 1981），兹不赘述. 不过，重要的是注意焦磷酸牻牛儿酯环化为各主要类别单萜烯的代表物时，已无庸怀疑地证明，没有从 C-1上失去氢（Croteau 和 Felton, 1981），而且这些酶催化环化又都不需要烟酰胺辅酶（例如，见 Gambliel 和 Croteau, 1982）. 一个特别令人鼓舞的观察是，发现从鼠尾蒿（*Salvia officinalis*）得到的一个酶体系能催化焦磷酸牻牛儿酯(*7.44*) 转化为（+）-焦磷酸冰片酯(*7.45*)，它随后被另一个焦磷酸酯酶水解为(+)-冰片醇（*7.46*）(图 7.26)(Croteau 和 Karp, 1977). Croteau 还发现不存在竞争烯丙基焦磷酸酯底物的掺杂的磷酸酯酶和焦磷酸酯酶时，焦磷酸牻牛儿酯是环化的优先底物，其 V_{max}/K_m 是它的顺式异构体焦磷酸橙花（neryl）酯的 20 倍(Croteau 和 Karp, 1979). 这些观察应用原样的植物都是不可能做到的，不仅如此，而且发现了环化产物本身就是一个焦磷酸酯，也为在实验上考察偶联的异构化——

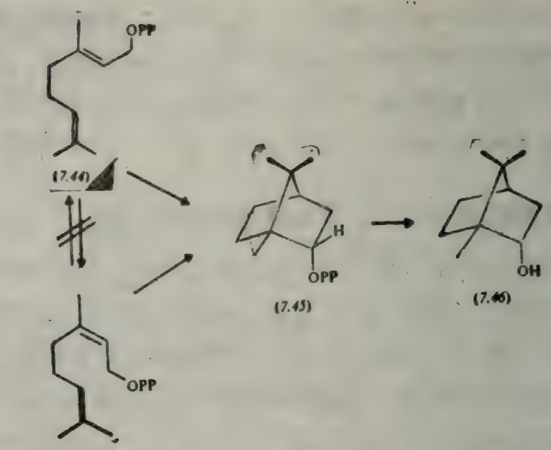


图 7.26　焦磷酸牻牛儿酯(7.44)转化为(＋)-焦磷酸冰片酯 (7.45)

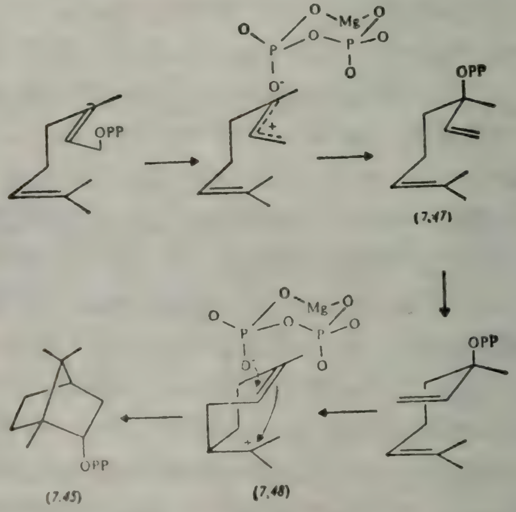
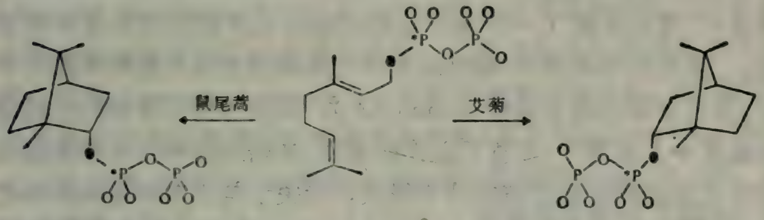


图 7.27　焦磷酸牻牛儿酯 (7.44)异构化——环化成为 (＋)-焦磷酸冰片酯的机理

环化过程中焦磷酸酯部分的功能提供了独特的机会。因此，我们与 Croteau 教授协作进行了类似于我们较早关于焦磷酸法呢酯异构化工作的 [^{18}O] 标记研究。

图 7.27 表明由焦磷酸牻牛儿酯生成（＋）-焦磷酸冰片酯的一个合理的模型，它与为曲古二烯的生成所提出的模型类似，并且以密切有关的化学模型为根据（Gotfredsen 等，1977；Gotfredsen，1978）。焦磷酸牻牛儿酯首先异构化变为它的叔丙烯基异构体，随后绕 2,3-单键旋转，产生类顺式（cisoid）构象的焦磷酸沉香酯（*7.47*），适于电离和对 6,7-双键发生亲电进攻。暂时产生的α-萜品基阳离子（*7.48*），形式上与倍半萜环化中的红没药基中间体（*7.36*）类似，能通过对新形成的环己烯双键进攻，得到的阳离子被配对的无机焦磷酸离子捕获，从而进一步环化。



(+)-(*7.45*)　　　　(-)-(*7.45*)

图 7.28 [1-^{18}O] 焦磷酸牻牛儿 [α-^{32}P] 酯被鼠尾蒿和艾菊转化为（＋）-和（－）-焦磷酸冰片酯

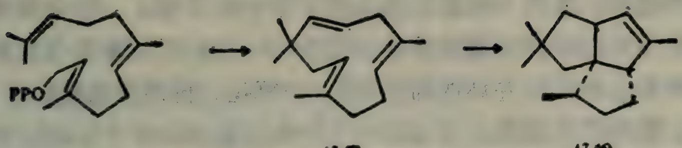
用 ^{32}P- 标记的底物所做的实验首先表明，在生成焦磷酸冰片酯时焦磷酸的两端保留它们的同一性（图 7.28）。[1-^{3}H, α-^{32}P]-和 [1-^{3}H,β-^{32}P]-焦磷酸牻牛儿酯各自与从 *Salvia officinalis*（鼠尾蒿）和 *Tanacetum vulgare*（艾菊）得来的，不含磷酸酯酶的（＋）-和（－）-焦磷酸冰片酯合成酶分别培养，得到 [^{3}H, ^{32}P]焦磷酸冰片酯，再选择性地水解为相应的磷酸冰片酯。测定 ^{3}H/^{32}P 比值，确定了只有从 [1-^{3}H$_2$, α-^{32}P] 焦磷酸牻牛儿酯产生的（＋）-和（－）-磷酸冰片酯才保留着 ^{32}P，由此排除了在环化过程中焦磷酸酯部分的翻觔斗式搅窜。以后又用 ^{18}O-标记的底物揭示了，在环化酶的活性位点无机的焦磷酸阴离子同萜类阳离子形成的离子对意外的刚性结合。譬如 [1-^{18}O] 焦磷酸牻牛儿酯与（＋）-焦磷酸冰片酯合成酶一同培养得到一个产物，由它衍生的苯甲酸酯用质

谱分析，表明保留了75至100%原来连接在C-2上的^{18}O同位素。类似的[1-^{18}O]焦磷酸牻牛儿酯与相应的(−)-焦磷酸冰片酯合成酶制剂一同培养，分析产生的(−)-苯甲酸冰片酯，证实了在环化过程中完全没有氧同位素的位置交换，产物(−)-冰片醇的^{18}O富集度与牻牛儿基前体相比，基本上没有改变。

暂时产生的无机焦磷酸部分，运动受到惊人的严格限制，这是出乎意外的，特别是鉴于我们较早的观察，即在密切相关的法呢基转化为橙花叔醇焦磷酸酯的酶促异构化过程中，观察到近侧磷酸氧的平衡化（Cane 等，1981b）。虽然在焦磷酸冰片酯合成酶的活性位点可能存在类似的焦磷酸牻牛儿酯与焦磷酸沉香酯之间的平衡化，但包含新 C—C 键形成的初始环化步骤极可能是不可逆的。当我们考虑到 α-萜品阳离子与焦磷酸阴离子暂时形成离子对，其中电荷分离至少为0.3nm(3Å)，观察不到同位素的位置交换就更令人惊奇了。尽管可以作结论说，初始的异构化步骤及随后的环化都比同位素位置交换来得快，但关于与正向和逆向异构化相比较的闭环速度则还没有可用的信息，也还不能确定旋转受限是由于酶与焦磷酸部分的相互作用，还是由于无机的焦磷酸-Mg^{2+}络合物对于配对的碳阳离子固有的强力吸引。不过，我们确实注意到，Poulter 最近的报告，同异戊烯转移酶一起培养，再从培养物分离出来的[1-^{18}O]焦磷酸牻牛儿酯，没有发生可检测到的搅窜，尽管有有力的证据表明在酶的活性位点有烯丙基阳离子产生（Mash 等，1981）。

7.3.4 焦磷酸法呢酯变为二环戊烷并环戊烯的无细胞环化

在经由红没药基阳离子或其等当物而进行的一些环化之外，还有为数不少、多种多样的一类倍半萜是通过起初焦磷酸法呢酯的C-1环化到末端双键，形成一个10员或11员环而生成的(Cane, 1981)。我们曾对几个含有二甲基环戊烷，形式上能由蛇麻烯(humulene)（*7.49*）衍生的这类化合物的生物合成感兴趣（Cane 和 Nachbar, 1978; Cane 等，1981d）。最近（Cane 和 Tillman, 1983）



(7.49) (7.46)

图 7.29 焦磷酸法呢酯经由蛇麻烯(7.49)环化为二环戊烷并环戊烯(7.46)

我们得到了一种链丝菌的无细胞萃取物,能够催化反，反-焦磷酸法呢酯生成二环戊烷并环戊烯（pentalenene)(7.46）的环化反应(Seto 和 Yonehara, 1980),从而对阐明这些代谢物所提出的许多生物合成问题作出了一个重要进步. 二环戊烷并环戊烯是并环戊烯内酯类（pentalenolactone）倍半萜抗菌素的母体烃，我们以前已确定了这类抗菌素的来源是甲瓦龙酸(图 7.29)(Cane 等，1981 d). 链丝菌 UC5319 加玻璃珠快速搅拌使细胞破碎，34 000g 离心分离得上清液. [8-$^3H_2$, 12,13-$^{14}C_2$] 焦磷酸法呢酯（$^3H/^{14}C$ 原子比=2:2）与以上酶制剂一同培养，得到了标记的二环戊烷并环戊烯. 根据回收的 ^{14}C 活性计算，周转速度为二环戊烷并环戊烯 0.03nmol/h · mg 蛋白质. 将回收的二环戊烷并环戊烯用合成的

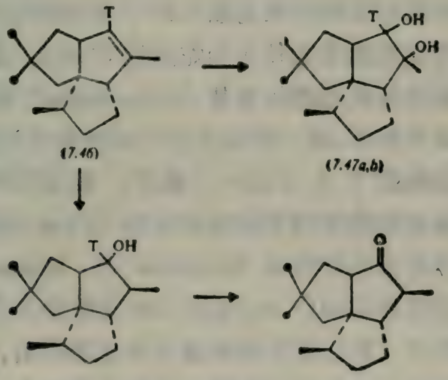
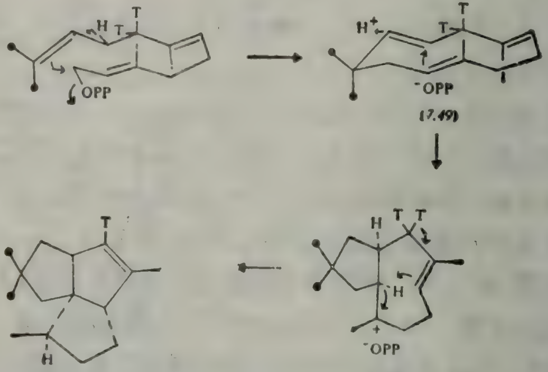


图 7.30 由 [8-$^3H_2$, 12,13-$^{14}C_2$] 焦磷酸法呢酯衍生的二环戊烷并环戊烯的降解

外消旋载体稀释，取一部分转化为顺式 6,7-二醇(*7.47*)的非对映体混合物，各自分别重结晶达到了恒定的活 性. 两个固体衍生物显示预期的损失原来所含氚的 50% ($^3H/^{14}C$ 原子比0.9:2). 剩下的二环戊烷并环戊烯先硼氢化-氧化，再用氯铬酸吡啶鎓氧化，得到二环戊烷并环戊酮-7 (*7.48*) (pentalen-7-one)，它基本上不含氚，由此得知 (*7.46*) 中所有的氚都位于预期的 C-7 位置 (图 7.30).



(*7.49*)

(*7.46*)

(*7.50*)

图 7.31 焦磷酸法呢酯转化为二环戊烷并环戊烯的机理

观察到的标记实验结果与图 7.31 中所示的途径是一致的，其中包括焦磷酸法呢酯首先转化为蛇麻烯 (*7.49*). 在 C-10 上再质子化引发蛇麻烯环化为原伊鲁基 (protoilludyl) 阳离子(*7.50*)，它能发生氢负离子转移，进一步环化为二环戊烷并环戊烯，同时失去原来焦磷酸法呢酯 C-8 上的一个质子. 图示的环化的立体化学以前已从完整细胞的馈饲实验得到证明 (Cane 等，1981d)，而原伊鲁基阳离子的环化在较早 Shirhama 与 Matsumoto (Ohfune 等，1976) 所报告的从(*7.50*)得到二环戊烷并环戊烯的仿生合成中找到了类似点. 我们过去曾根据立体化学提出，中间体蛇麻烯的酶促生成和进一步的环化在同一活性位点发生 (Cane 等，1981 d). 与这个假说相一致的间接证据是：试图用无标记的载体稀释

陷捕（dilution trapping）测定的结果，看来在培养介质中不存在游离的蛇麻烯。当能得到一个明确的酶体系时，我们希望通过确定在生成蛇麻烯时失去的质子是否能参与随后的再质子化，引发起进一步环化，从而检验这些想法。二环戊烷并环戊烯合成酶的反应也提供了一个可用来测定分子内 $S_{E'}$ 反应立体化学的便利手段，在整个环化反应系列中，有两个这种反应的实例。

有关萜类酶的探索开辟了广阔的新的研究领域，其中我们的工作仅是一小部分。随着无细胞体系的应用，现在已明显看到，在多酮衍生物（polyketide）和生物碱的生物合成中有同样令人鼓舞的可能性。这些新发展起来的研究工具，如果不仅用来解决传统的完整细胞技术所能应付的老问题，而且对于自然界用来合成复杂有机分子的途径，以及为实现合成任务而研制的奇妙催化剂，能提出完全崭新的问题，其价值就极为可观了。

第八章　酶学在生物学内外的影响

Keith E. Suckling

(Department of Biochemistry,
University of Edinburgh Medical School, Edinburg, UK)

8.1 引　　言

生物化学，连同包括酶学在内的一些主要组成部分，在物理科学和生物科学的领域中占据中心的位置，提供了两者之间的一个纽带以及自然科学中这两个主要分支可以在一起实践的共同场地．生物化学的发展一直是而且将继续是决定性地依赖于物理和化学方法对于生物问题的应用．本书的较大部分，考察了来自生化研究的一个领域，即酶学的思想和概念怎样在激发其他领域，主要是对化学的工作很有价值．我们已经看到，与生物学家一同观察使许多化学家产生了灵感，他们希望追赶和利用酶那种难以捉摸而又绝妙的选择性和催化能力．

但是，对于生物化学家，特别是生物学家，酶的研究仅仅是包含各种生物过程的广博得多的学科中一个部分．在某种意义上，或许可以把生物化学看成为一种集成酶学，因为生化过程的绝大部分依靠酶的催化，或者依靠其它具有许多酶样性质的蛋白质．在生物学中，重要的不仅是研究酶的催化机理，而且要研究它所催化的反应速度怎样受到调节，因此酶学扩展到整个细胞和有机体的范围．在几乎任何进行生物学工作的领域都能找到生物化学家和他们的方法，这事实说明这一学科的宽广范围．学术上的主题名称在这里并不重要，在可能被称为植物学、动物学、遗传学、免疫学、

临床化学、外科或内科医学的机构中，开展着生物化学(因此也有酶学)的业务．给这些机构题名的人如此别出心裁，以致能使机构名称增加许多倍．这种广阔的多样化是生物化学对生物学作为一个整体已有很大影响的证据．这一事实的言外之意必定是，更经典的生物学和医学领域的专家们看到了生物化学技术和概念对他们的研究领域特别有关系．考查一些非生物化学教科书中如下一些叙述，我们可以找到酶技术重要性的证据：

> “除少数例外…，人类生化遗传学研究的进展依靠了越来越高级的分析蛋白质结构和定量的方法．”(Brock，1978)
>
> “在全世界医院实验室中，广泛地应用酶活性测定作为诊断疾病之助手，是现代医学给人最深刻印象的发展之一．”(Wilkinson，1976)
>
> “组织化学的一个特别重要的分支是与酶的定位相联系的．”(Lewis，1975)

但是，一个学科，它的概念和方法被在其它专业中受训练的工作者如此广泛用作研究基础是潜在着危险的．方法和概念都一样正确的应用有赖于对它们所依据的基础科学有清楚的了解．当然这个问题生物化学家并非不知道，他们可能有时由于在物理、化学和生物科学之间处于中心位置而感到安全和受到保护．有一个熟知的说法：生物化学家是对化学家谈生物学，对生物学家谈化学的科学家(生物化学家彼此间交谈还有一些变相的说法)，就暗示这种心态．

通过考察那些不以酶及其分子性质作为主要对象的领域，我们或许能最清楚地看到酶学对于生物化学的影响．酶学对这些领域的影响，像对整个生物化学一样，可以有以下几种形式．

1. 在更一般的意义上，酶学是一个较宽的生物化学研究领域，即蛋白质化学的一部分．具有酶功能和其它功能的蛋白质的研究一直是平行发展、互相影响的．对于许多化学家，酶的研究占主导，但是在非酶蛋白质的研究中也有很多重要的化学问题．可以用类

似于研究酶的方法来研究的范围很广的蛋白质，汇集在表 8.1 中. 酶催化反应在一些更复杂的生理过程中也很重要，像肌肉收缩(Adelstein 和 Eisenberg, 1980)、血液凝结 (Jackson 和 Nemerson,1980) 以及由补体体系除去外来细胞(Reid 和 Porter, 1981). 为了说明酶研究与无催化活性蛋白质功能研究之间的类似性，我们将在 8.2 节的末尾考察血清脂蛋白化学的某些方面.

表 8.1 非酶蛋白质体系

体　系	功　能
血红蛋白	血液中氧的可逆结合 (Perutz, 1979)
抗体	对抗原的特异性非共价结合(Amzel 和 Poljak, 1979)
血清脂蛋白	结合不溶性的脂类分子以利于在血液中输运 (Smith 等,1978)
钙调蛋白(Calmodulin)	结合 Ca^{2+}. 金属-蛋白质络合物引发或调节细胞内代谢(Klee 等, 1980)
乙酰胆碱受体	结合从神经肌肉结释放的乙酰胆碱，引发肌肉收缩(Conti-Tronconi 和 Raftery, 1982)
阻遏物蛋白	与细菌中 DNA 的特定区域相作用,调节转录(Ptashne 等,1982)
细胞骨架	某些蛋白质（例如微管蛋白）结合在一起并与细胞膜结合，在细胞内形成网络(Timasheff 和 Grisham, 1980)
内吞作用	一种命名为笼合素 (clathrin) 的蛋白质，组织质膜以便在细胞上形成小泡，容许摄取物质进入细胞 (Pearse 和 Bretscher, 1981)

2. 酶本身可以作为工具，例如用在临床化学中. 又发展了酶与电镜和免疫学等其它技术结合的方法(8.3 节).

3. 从酶研究衍生的最成功的一些概念可以应用到其它体系. 这种概念的转移在激发新的研究领域中非常重要. 蛋白质结构、构型和小分子结合到蛋白质的特定部位等概念对非酶体系广泛有用. 此外，似乎奇怪的是酶学的许多重要概念是在研究血红蛋白

(表 8.1)中发展出来的，这种蛋白质被称为"名誉酶".稍后(8.4 节)我们将看到，从研究溶液中酶衍生的一些概念，直接应用到更复杂体系时可能产生的问题.

4. 在本章的最后一节，我们将从主要历史性的讨论转到预测一下未来酶学将如何发展和对生物化学的影响. 本书前一些章中已更着重在化学领域中考察了酶化学对未来的影响，但是不应当忽略生物学在更宽广范围内的进展.在生物学许多领域中，现在试图作详细分子研究的时机已经成熟，有些领域可以试验现在分子酶学的能力和适应性.在有的领域，我们称之为"小底物分子"酶学的一些概念被证明有局限性. 其底物是核酸之类大分子的越来越被充分表征的蛋白质，现在能够详细地研究. 在这里，由于核酸分子的复杂折叠，需要更复杂的形貌考察.迄今以纯化形式在稀水溶液中被研究的一些蛋白质，在细胞内可能处于相当不同的环境，因而需要评价可能产生的蛋白质-蛋白质间相互作用的影响.许多蛋白质被局限在生物膜中部分亲水的环境中，虽然过去 10 年关于膜结构基本概念已取得巨大进步，但这些体系没有一个得到了良好的分子水平的了解 (8.4 节). 表面上看性质与生物化学完全无关的一些领域，例如分类学和演化，也应该从酶结构和功能产生的概念得到新的见解.

由于技术在不断发展，磁共振技术应用于研究蛋白质结构和酶机理近年来取得卓越的成就 (例如见第六章). 像我们已看到的，酶催化机理的更深入的了解，使得我们能设计更精妙和特异的探查分子. 甚至更精采的是现在已能做到通过遗传工程对蛋白质结构加以修饰. 小规模分离大分子以及蛋白质和核酸序列测定等分析技术在继续不断改进，这将为研究一些重要体系的分子细节创造条件，由于种种原因，用现已确立的技术还达不到.

在本书的剩余篇幅我们将较详细地考察在本书开始讨论中提出的某些问题，说明与酶研究平行发展和在其发展的适当阶段，借助于物理、化学技术与具有酶学特色的概念的生化领域中某些成功. 以下所述对生物化学家并不新鲜，但化学家可能发现在本书

末尾会拓宽视野是一个合适的有余不尽的结束.

8.2 非酶蛋白质

酶所能达到的迅速和专属性的催化作用是受到化学家注意和向往的一个主要因素,由于学科的性质,他们对化学键合以及化学键如何形成和断开特别感兴趣.显然酶的专属性依靠识别底物,并优先与它们相作用的能力,这可作为化学反应的序幕或前奏. 但是,识别一个小分子或大分子的一部分的专属性是许多蛋白质的共同性质,而并非酶所独有,像随 Fischer 之后少数有识之士所见到的那样(第一章). 除了化学反应的催化作用,许多生物过程也要求类似的精确识别,这通常是由具有对所涉及分子的专属性结合位点的蛋白质提供的. 结合后可继而发生其它一些作用,由此引起某种生物响应. 表 8.1 中列出了某些生物体系,其中蛋白质的精确分子相互作用是主要的,但并没有化学反应被催化.

所有这些体系的研究构成被称为蛋白质化学这一领域的一部分,在这领域中,非酶蛋白质与酶的研究并行发展. 往往在研究无酶活性的蛋白质的不同本性和功能时产生额外的问题. 一个重要例子是化验(或定量测定)某给定蛋白质的方法. 酶的存在通过测定它所催化的反应速度比较容易检测. 许多孤立的非酶蛋白质唯一可测定的响应可能只是对适当配体的结合. 像这样一些没有化学反应发生的相互作用,要灵敏地测定就困难得多. 这类测定方法包括伴随结合发生的蛋白质荧光发射或圆二色性的改变. 这种效应时常与蛋白质跟配体相作用时发生的构象改变相关联(见下面及 Freifelder, 1982). 还可用物理方法测定这种结合,用超滤、渗透或特异性吸附等方法分离结合着配体的与未结合配体的蛋白质. 另外一些蛋白质可能只有通过极特殊的性质,如不寻常的吸收光谱或凝胶电泳时的特征迁移率等来认识. 表 8.1 中列举的许多体系,研究的成功决定性地依赖于应用适当的化验方法.

或许最好通过实例来说明酶和非酶蛋白质结构与功能研究中

的类似点和差别点.脂肪是膳食的一个主要组分,也是身体的主要能量贮存.由于脂肪(化学上是三酰基甘油)是极不溶于水的,身体必须提供一个机制,使脂肪能在血液中从贮存它的组织到氧化它产生能量的组织之间输运. 这是通过脂肪与特异的血浆蛋白质相缔合,形成具确定结构的庞大的多分子聚集体或粒子来达到的.这些粒子被称为脂蛋白,因为它们既含脂肪又含蛋白质. 由于在血液循环的类型不同,脂蛋白的量与某些循环系疾病,如动脉硬化的发生看来存在关系,近年来对它们进行了大量研究 (Goldstein 和 Brown, 1977).形成这些粒子一部分的许多蛋白质已经被纯化,并考察了它们的结构,以便了解它们怎样能与三酰基甘油以及其它类脂如胆固醇、胆固醇酯和磷脂等特异性地相作用,有效地使它们大量增溶. 某些这种蛋白质,或者如人们所称的脱辅基脂蛋白,有另一个功能. 同参与脂蛋白的总体结构一样,它们还被某些细胞质膜上的受体所识别,而这种识别作用被认为引发了整个粒子被细胞摄取和降解的过程 (Pearse 和 Bretscher, 1981).

在分子水平上研究蛋白质通常首先要求的是纯化. 对于脂蛋白这不太困难,因为脂肪与蛋白质结合使粒子的密度与单独的蛋白质很不相同. 粒子中脂肪的量越大,它的密度越小,因而可以用超速离心法将粒子与其它蛋白质分离开. 同时,由于脂蛋白中脂肪和蛋白质的相对含量不同,可以把它们分为不同级别(表 8.2).

表 8.2 人类血浆脂蛋白

	乳糜粒	VLDL	LDL	HDL
密度范围	0.95	0.95—1.006	1.006—1.063	1.063—1.210
主要类脂	膳食 TAG	内源 TAG	胆固醇及其酯	磷脂,胆固醇酯
%蛋白质	2	10	25	50
主要脱辅基蛋白	A-I,B,C	B,C,E	B	A-I,A-II

注: VLDL = 极低密度脂蛋白; LDL = 低密度脂蛋白; HDL = 高密度脂蛋白, TAG = 三酰基甘油(甘油三酯).

脱辅基蛋白的分布是脂蛋白类型的特征．例如，高密度脂蛋白或 HDL 含有一种被称为脱辅基 A(Apo A) 的主要蛋白质．这种蛋白质能从 HDL 级分以足够数量纯化，使得能详细地研究它的结构．在某些方面，这种详细考察比许多纯化酶的研究还更深入一些．

对于可利用的纯脱辅基 A，首先要回答的问题之一是，它如何能与类脂相作用而又不从水溶液沉淀出来．脱辅 A 看来能强力地与磷脂类相作用，这是一类极性类脂，结构上与三酰基甘油有关，它又是生物膜的一个主要结构组分（见图 8.3）．磷脂的结合可以通过蛋白质圆二色性和荧光光谱的改变来测定，它们反映蛋白质适应配体时发生的构象改变．已经发展出从多肽链氨基酸顺序的知识预测多肽链折叠的方法（Chou 和 Fasman, 1978）．脱辅 A 的一级顺序(即氨基酸顺序)是已知的，根据这个顺序，已作出该多肽链折叠的预测(Andrews 等，1976)．预测的结构示意地表示于图 8.1 中．我们预期可以找到表明有结合类脂的疏水区和有利于与水相作用的亲水区的结构．图 8.1 提示这可能通过形成螺旋结构，使螺旋一边的氨基酸残基主要是疏水的，而相反一边则主要是亲水的来达到．

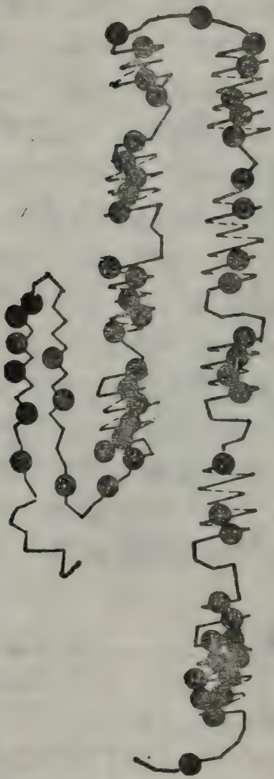


图 8.1 人类脱辅 A-I 的二级结构 黑圈表示疏水残基，可以看出在蛋白质的九个螺旋区中它们互相靠拢聚集在一起，这些被认为保证了脱辅基蛋白质结合类脂的性质(据Andrews 等，1976绘图)

有了这种结构数据，酶学家可能进而试图认定对催化作用有重要性的氨基酸残基，作为研究催化机

理的第一步．在这里可以提一个类似的问题：知道脱辅基蛋白质的哪一部分对于结合类脂最重要，是会有用的．对这个体系有一个很精密的化学途径可以利用，但酶学家通常是办不到的，因为多数酶比脱辅 A 更大，结构更复杂．这个途径就是用化学法合成脂蛋白的碎片，看看它们是否自动地形成预料的螺旋结构．

这种类型的合成已经对许多脱辅基蛋白用改型的 Merrifield 固相法进行（Sparrow 和 Gotto，1980），并且鉴定了 apoA-I，apoA-II 和 apoC ［得自 LDL（低密度脂蛋白）］的类脂结合范围．活化血浆中一些酶所需的这些蛋白质的碎片也已经确定．在某些情况下，通过研究发现了不是根据一级顺序的计算所预料的类脂结合区．体内类脂的运动是一个复杂的动态过程，其中有组织与脂蛋白相互作用，又有脂蛋白粒子本身之间类脂与蛋白质分子的交换．因此，这些结构研究是旨在描述体内类脂代谢的一些动态过程这样一个大得多的研究范围的一些部分．

这个例子表明，一个具有简单功能，即结合类脂分子的蛋白质，可以按很类似于酶研究的方式，在分子水平上进行很深入的考察．这项工作以及其它许多工作表明，蛋白质化学的威力在于对功能与酶很不相同的一些分子能够进行研究，并有同等成功的希望．

8.3　酶作为生物学工具的应用

在本书前面我们已看到，酶怎样可以应用于化学合成和有关的活动范围．在这里酶具吸引力的主要特点是可能得到的高度专属性． 对于时常在生物体液中存在的复杂混合物中小分子的分析，这一性质也是重要的．酶的选择性使得时常并不需要预先纯化所针对的物质就能作测定．如以下摘录所表明的，这种类型的应用早就被临床科学家所赏识了．

> “这些应用(酶法化验）仅构成整个临床化验的一小部分…(本世纪 30 年代)，现今在较大的医院实验室中酶

法化验可能占总工作负荷的25—35%."(Kachner,1970).
对于80年代这很可能是过低的估计. 在赞成这一观点
的同时，Schmidt (1979) 写道"有根据担心泛滥的测定
中有一大部分是无用的."

现在一些临床实验室用以酶为基础高度自动化的方法进行许多小分子代谢物的测定，已是常规的了. 常见的例子如血液中葡萄糖或胆固醇浓度的测定（图8.2). 测定这两个十分不同的化合物的工作原理是相同的. 葡萄糖或胆固醇被从微生物得来的酶氧化，同时生成过氧化氢，随后将一种染料氧化到有色形式，可以用分光光度法测定.

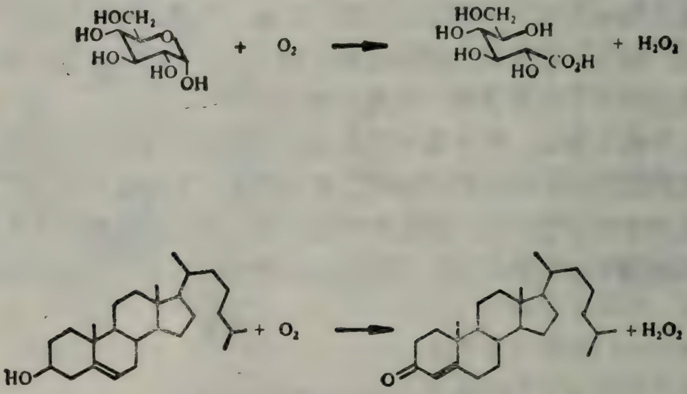


图 8.2 葡萄糖氧化酶(上)和胆甾醇氧化酶(下)所催化的反应

从患者本人得来的酶也可能在诊断上有重要性. 血液中某些酶的存在是特定的组织损坏的良好提示，这常常可以通过测定存在的是几种组织特异性形式中的哪一种来精确地表征. 例如，血液中转氨酶水平的升高可以用来作为心肌梗塞的指标. 这一观察首先于1954年作出，对现代临床化学的发展起了重要的促进作用(Wilkinson, 1976).

像前面引用的摘录中已指出的，如果要使这种方法有足够的

可靠性应用于临床，还需有某些重要要求。首要的是对用于测定的酶，在所用反应条件下的动力学行为必须有很好的了解。如果要测定酶催化反应的速度，重要的是底物要以饱和的浓度存在，使得被测定的速度仅依赖于存在的酶量。如果是用酶来测定一种代谢物的浓度，就必须有把握在所测浓度范围内容许完成反应的合适的时间。在临床上同样重要的是，以酶为基础的分析方法，无论关系到测定方法还是从患者采样的条件，都在地区、国家或国际的范围内标准化了。这种类型的测定有很大的变动范围不能归因于酶，而是由于采样和样品保存的方法(Schmidt, 1979)。

过去 10 年中生物学方法最重要的进展之一是用抗体能得到的特异性结合(表 8.1)。更近一些时候，这种技术的范围随着单克隆抗体的出现而扩大了 (Yelton 和 Scharff, 1981)。抗体是动物对外来的大分子或细胞的挑战起反应而释放到血液中的。抗体是一些蛋白质，具有共同的一般结构，但其中加进了可变区域，包含着针对特定的外来物或抗原某部分的结合位点。抗体-抗原相互作用的分子本性已被较详细地研究(见 Suckling 和 Suckling, 1980a, 有所讨论)。围绕抗体发展了一系列测定很小量生物分子如多肽和甾体的方法。最广泛应用的是完全依靠抗体对抗原之结合的放射性免疫测定法。更新近，利用酶所能提供的灵敏度放大作用又发展出一些方法 (Engvall, 1980)。Engvall 最有力地道出了酶对于这些方法的重要性：

> “酶学是酶倍加免疫测定技术 (EMIT, enzyme multiplied immunoassay technique) 成功的关键”。

在 EMIT 中，被测定的小分子由共价偶联到酶上，形成一种酶共轭体。苹果酸脱氢酶可能是一种合适的酶，因为通过跟踪它的辅酶 NADH 浓度变化引起的光谱吸收变化，容易用分光光度法测定它的活性。一定量的酶共轭体与一定量的针对被测分子所产生的抗体一同保温培养，将不同量的未知物加到一系列这种培养中，它们妨碍抗体与酶共轭物的结合，其程度依赖于所加未知物的量。像这样，结合于酶共轭体的抗体的量随未知物浓度而变

化，酶活性与结合的抗体量，因而也跟加到培养中的未知物量成比例地被改变．结合效应因运用了酶测定法而更加明显，这种测定快速、准确、而又灵敏．未知物的实际浓度通常是从同样条件下制备的校正曲线上读出的． 能够用 EMIT 分析的化合物包括甲状腺素和巴比妥、庆大霉素、茶碱之类药物．

这种技术有许多优点，胜过其它与酶结合的方法，例如酶结合免疫吸附剂测定法(ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay)，特别是不需要从结合的未知物分离出游离的抗体．但是，后一方法可以测定的物质较多（Engvall, 1980)．

许多细胞生物学的研究，要求关于蛋白质在细胞中和在原来的较大机体中情况的信息．如果一个蛋白质能用放射性原子标记，它的生物化学命运就可以在动物全身跟踪，也可应用显微方法在细胞内跟踪．制备这种标记蛋白质最广泛应用的手段是放射性碘化．有几种化学方法可用于这一目的，而也许是最温和的可用方法有赖于酶的应用．乳过氧物酶能够选择性地催化蛋白质中酪氨酸残基的碘化，这一反应与氯过氧物酶催化的反应（第四章）关系密切． 放射性碘被引进暴露在蛋白质表面的那些酪氨酸芳环上(Morrison, 1980)． 这种放射性碘化蛋白质不仅在整个动物、组织和亚细胞水平上研究它们的代谢作用时有用，而且可用于放射免疫测定．

在亚细胞水平上，另一个过氧物酶，辣根过氧物酶可以用作示踪物．像胞饮作用，即细胞摄取它外部介质的一小部分进入细胞内的小泡等等之类的作用时，可以用这种方式研究．过氧物酶摄入细胞之后的位置可用电子显微镜观察．先让酶与一种底物反应，以便在试样中酶所处的部位产生电子致密区．将过氧物酶偶联到对感兴趣的细胞蛋白质有特异性的抗体上，增大了用这个酶可以在细胞水平观看到的体系的范围(Lewis, 1975; Dempsey 和 Vernon, 1980a)．这一类型的技术使得特殊类型的细胞可以从它们所含的酶来检出．例如释放胆碱的神经元可以由胆碱酯酶的存在来检出．也可以在细胞内确定酶的位置，如溶酶体中的酸性磷

酸酶．这些技术的控制应用使我们能作出细胞内某种酶活性分布的测定．

酶在临床上的另一种应用是作为治疗剂(Holcenberg, 1982)．例如，一些氨基水解酶被应用于癌的化疗，使肿瘤细胞耗尽某些生长所必需的氨基酸．这是癌化疗的一种通用战术，在这里用酶而不是用小分子作为武器．

以上一些例子只是选出少数以酶作为工具在其中起重要作用的生物学领域．酶研究还引出许多重要概念．例如，一些酶动力学的简单概念在设计用酶作临床化验时很重要．出自酶学的一些分子概念也影响了在其他领域工作的生物学家思考问题的方式．下面我们将考察这种概念如何影响生物学和生物化学实践的某些例子．

8.4 酶学概念的影响

酶可能是在分子水平上了解得最好的一类生物大分子．蛋白质结构的一些概念，包括多肽链折叠和由此产生的区域组织(domain organization)(Rossman 和 Argos, 1981)，活性位点和特异性结合以及构象和构象改变的重要性 (Gutfreund, 1980)，都是从这一领域发展出来的．小分子(底物和抑制剂)与酶的相互作用，通常可由研究反应动力学来检查，成为了解许多非酶体系中类似现象的原型．在某些情况下，例如前面讨论过的脂蛋白，可用的信息导致一种分子描述，至少与对许多酶所得到的同样好．不过多数情况下，我们不得不满足于与少数已在分子水平很好了解的大分子体系类比而作出的推论．尽管过去 30 年中酶学有巨大进展，这样的体系仍为数不多 (Warshel, 1981; Pincus 和 Scheraga, 1981)．生物化学上的"经典"酶，如胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶、溶菌酶、还有血红蛋白，可以包括在内．

显然要花许多年时间才能达到在分子水平上详细了解一个蛋白质，因此生物化学家不可避免地应用从"经典"研究得出的一些

概念，可能作出满足多数已被接受的机理判据，但并没有证据支持的一些提法．例如，讨论由结合配体引起的酶活性改变，或某种类似过程，可能归因于蛋白质的"构象改变"（Suckling 和 Suckling, 1980 b）.这种改变对于许多蛋白质是熟知的，例如己糖激酶（Bennett 和 Steitz, 1978）和血红蛋白（Perutz, 1979）.

最常见的是借助于这种概念来合理地解释某种观察到的行为，通常是解释动力学实验结果．用弯曲箭号解释反应分子行为的有机化学家很熟悉这种手段的局限性（Suckling 等,1979）．当应用这样一些有力的概念可靠地并以一定深度描述所考察的过程失败时，他也可能觉察到这种自我欺骗的危险性．当一些概念被应用到远离出发点的领域时，类比法很快变得无能为力了.

在生物膜这一有关的生物化学领域中，应用概念上有用但并不精确的机理来解释实验结果时也发生类似情况．生物膜由磷脂分子的双层组成，其中镶嵌着蛋白质(图 8.3).在最简单的模型中，蛋白质能自由地在双层所形成的二维流体中扩散．显然扩散能达

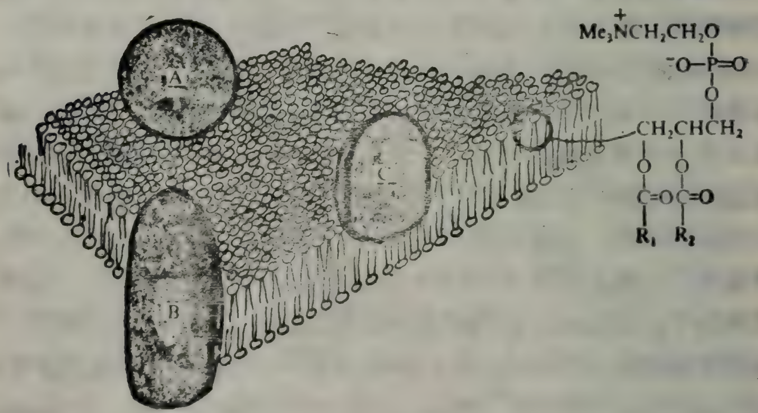


图 8.3　膜结构的液体镶嵌模型

与磷脂双层结合的有仅由离子相互作用结合着的外围蛋白（外在蛋白）（蛋白 A），和具有结合于膜的极性头部及非极性心部等区域的整合蛋白（内在蛋白）．蛋白 B 透过整个磷脂双层，蛋白 C 仅透过它的一半．插图表示典型磷脂(磷脂酰胆碱)，其中 R_1 和 R_2 是烃基.

到的速度将依赖于流体的微观粘度，而这又受控于类脂中存在的脂肪酸以及温度等条件．对于给定的整合膜蛋白的活动可能存在某种最优的流动性，看来是合理的．例如，这种特定的流动性可能对于维持蛋白质的活性构象是必需的．膜流动性的重要是广泛被承认的（Lee，1981），但迄今还没有在分子水平上很好了解了的体系．可以让我们以某种方式把膜的物理性质直接与蛋白质分子结构相联系，来解释观察到的活性．在这种更复杂的生物体系中，某些酶学的基础概念需要对每一个被研究的体系加以试验．我们将很快回到这一问题上来．

酶学的概念应用到更宽广的生物体系还引起另外一个问题．关于这些最简单的概念中某些确切的含义，生物化学家们并没有完全一致．生物化学的概念，像许多科学中一样，当它们的实验基础受到检验时会发生改变．时常一个名词的含义被改变，通常是朝着更精密或专门化定义的方向．酶抑制动力学的研究是一个合适的例子．多数学生在学习生物化学的早期就知道可以区分各种类型的酶抑制，它们得到像“竞争性”、“非竞争性”和特别没有信息意义的“无竞争”（“uncompetitive”）这样一些名称．“竞争性”这个词的应用似乎从开头对抑制的分子机理就带有一种暗示．一个自然的解释是，抑制剂与底物竞争着结合到酶的活性位点．随着对动力学和酶机理了解的发展，生物学家对于这些词的含义发生了争议．

为了正确考察这些差别，目前对酶抑制简单机理可以概括如下．可以分为两种主要类型的抑制，酶共价结合到抑制剂的不可逆抑制及可逆抑制．各种竞争性抑制属于第二类，即可逆抑制．一个酶的简单动力学研究包括两个基本参数的测定，V_{max}——反应可达到的最大速度，和 K_m——达到最大速度的一半时某给定底物的浓度．各类可逆抑制最好按这两个参数来定义．在竞争性抑制中 K_m 增加，但 V_{max} 不受影响．对于无竞争性抑制，K_m 和 V_{max} 以同样倍数减小．在非竞争性抑制中 V_{max} 总是减小，而 K_m 可能增大、减小或不变．抑制类别的最初确定是直接从动力学得

到的，随后可能作出分子的解释．这种解释顺序对于许多生物化学实验是重要的，对平常化学实践也很常见(第二章)．

按一种已发表的看法 (Price，1979)，在动力学研究中所能作的，无非是在各种条件下测定酶催化反应的速度．从这种实验得到的数据并不能让我们作出关于酶的分子结构及其与底物和抑制剂关系的结论．动力学研究确实使我们能确定底物和抑制剂结合到酶的次序，并且提示究竟是两个底物分子，还是一个底物和一个抑制剂能同时结合到酶上．这种结果也可能有一些关于结构的暗含的关系．这一看法不强求“竞争性”这个术语象咒语样召来的相当精确的分子图象．按不同于传统的暗含在“竞争性”一词中的分子相互作用机理，很可能得出同样的动力学数据．

这种术语的严格应用，应当只具有动力学意义，反映对于某反应得出的速度方程式，并没有被某些生物化学家所恪守 (Pace，1980)．Pace 感到机理的定义更可取，尽管事实上这违背了实践中进行动力学研究所用方式的逻辑．以上比较实验取向的看法被认为是没必要的卖弄学问而被摒弃．但是国际生物化学联合会采取了前一立场 (NCIUB，1982)，也提出了用于抑制作用的完全用实验上的词语表述的动力学常数的明确定义．

作为前述争议起因的动力学实验中，酶通常以可溶的形式被研究，而底物和抑制剂都是小的水溶性分子．可以假定分子是在三维的溶液中自由扩散的，而且反应物的浓度可以准确地知道．在有高度纯化酶的今日，酶的浓度也可以准确地知道．对于一个有意义的动力学研究，有这样一种确定的体系显然是必需的：酶学家时常被告诫，不要浪费“纯洁的思想在不纯的酶上”．再回到生物膜，我们能立即看出情况更为复杂． 在这里蛋白质即令扩散，也只能是随着把它们限制在内的膜一道，或者在这膜之内扩散．这些酶的底物也可以是不溶于水的，而且可以想象能通过在膜中扩散达到酶的活性位点．像这样，底物和酶都被限制在基本上是二维的、粘度与水大不相同的流体中．

基础的动力学参量 K_m 和 V_{max} 通常被作为酶的属性，这一

看法要求假设在酶催化的反应中，从底物结合于酶开始，所有可能的速度限制步骤，都是酶本身的属性．对膜结合的酶可以测定 V_{max} 和 K_m，但是在这些较复杂的体系中，情况也较不肯定．例如，我们不知道酶所遇到的底物的浓度，因为底物可以在水溶液和膜相之间分配，达到未知的程度．我们不再是与一个匀态溶液打交道．对这样一种体系得到的动力学参量只有在实验所用条件下才是有效的，并且规定整个实验体系的行为．例如，假若想出一种更有效的方式把底物交付给酶，那么两个参数中任一个都可能发生改变．如果底物在膜内扩散是速度限制的，那么 V_{max} 的值将反映这一情况，而不是酶的催化性质．对于工业上应用的固定化酶也存在类似情况．在这里体外溶液中测定的 K_m 和 V_{max} 可能与已经固定化之后酶的动力学性质毫无关系．实际上，在这种过程中，底物扩散到酶和产物扩散离开酶，都可能成为速度限制因素．描述这样的体系需要一种不同的处理（Goldstin，1976）．

8.5 生物化学在最近和将来的发展

生物化学目标在于在分子水平上明确生活体系中的事件．这一点似乎是不足道的常谈，但却是值得经常强调的有待解决的问题(例如，Kornberg，1980)．生物化学中许多早期步骤是在酶学中采取的，如此获得的成功依靠了应用来自化学、物理学和生物学很广泛范围的各种方法．本书的很大一部分着重分析了酶学对化学科学的其它领域的影响，这样做只考察了一个双向过程的一个方面．物理和化学纯化、分析和结构测定方法是酶学家的主要工具．如果酶化学现时正在对其它化学领域产生巨大影响，我们可把这看成是当初向这些领域借用方法的报答．

交流还在继续，我们对分子事件的掌握随着每一个新方法的应用而改进．近年来分析技术已变得灵敏得多了，现在用非常少量的蛋白质或核酸就可以纯化和测定它们的序列(Walsh 等，1981；Dempsey 和 Vernon，1980 b)．核磁共振仪器的最新改进使得能

够在溶液中测定大分子和它们的组成畴的构象和活动性(Reid, 1981; Steitz 和 Shulman, 1982)。这些结果可以与用在固态,或者更准确地说结晶态的主要结构分析方法X射线衍射得到的图象相比较。核磁共振方法还使我们能够测定原状细胞中酶催化反应的速度(Gadian 和 Radda, 1981)。酶的活性位点也能用核磁共振方法直接观察(Cohn 和 Reed, 1982)。按这样方式,可以检验用打破和进入细胞的经典生物化学手段所得到的知识,而且还可能评价迄今没有观察到的细胞内环境的作用。

随着知识的进展和设计化学反应的概念基础得到发展,对生物体系的化学研究变得更精细了。特异性抑制剂和机理探测剂的应用已在第二章中讨论。蛋白质的化学修饰这个已被广泛应用于研究结构与机理功能之间关系的手段,由于遗传工程技术而变得更加精巧了(Abelson 和 Butz, 1980; Ulmer, 1983)。

通过化学和生物学方法的结合,将有可能合成一个 DNA 分子,为所希望要的,在任何所要求的位置含有特定氨基酸替换物的蛋白质编码。这将有可能研究在实验室产生"突变型"蛋白质的性质,和观察在蛋白质结构的关键部位很微小变化的效应.近来已经证明,改变 DNA 中一个碱基引起蛋白质中一个氨基酸的单一改变,已足够使其中发生这个变化的细胞转变为癌细胞(由 Logan 和 Cairn, 1982 综述)。

许多迄今在分子水平上了解较差的领域涉及其中有两个或更多大分子相互作用的重要生物学过程。在 DNA 合成和它转录为 RNA,以及在核蛋白体上组装蛋白质时,都有发生这种相互作用的例子(Brimacombe 等,1978; Wittmann, 1982; Wool, 1979)。图 8.4 表明在这类体系中所必需的某些拓朴学的考察(Champaux, 1978; De Pamphilis 和 Wassarman, 1980)。在形成共价键所要求的一些化学相互作用发生之前,核酸的构象必须发生许多改变.这些改变又要求,在巨大的 DNA 分子和它缔合的蛋白质旋转到所需反应性构象时,发生许多非共价键的断开和形成.由于在这些体系中比在经典研究过的较小蛋白质中存在较高水平的分子组织

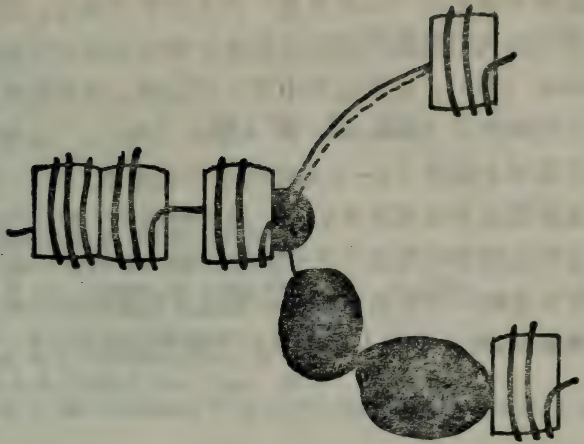


图 8.4 真核细胞染色体的复制分叉. DNA绕在核小体上,核小体由称为组蛋白的蛋白质核心组成. 在核小体核心中发现 8 个组蛋白分子, 两个相邻的核小体之间有一个组蛋白分子. 螺旋去稳蛋白质 (helix destabilizing protein) 促进 DNA 螺旋从组蛋白解离, 并自已松开成为两个单股. 在两股上都进行 DNA 聚合酶催化的 DNA 复制. 在型板股上产生的 DNA 片段由 DNA 连接酶连接起来. 当有组蛋白分子可用时,就形成新的核小体. (根据 DePamphilis 和 Wassarman, 1980 绘制)

化, 过程的分子图象需要有一种新的描述一类大分子拓朴催化作用的方法,才能讨论已被传统了解的一些过程 (Gellert, 1981).

在讨论许多其它生物学过程时也需要对这种大结构 (macrostructural) 进行考察. 前面已提到了蛋白质在核蛋白体上的合成, 在膜生物学中,时常发现一些蛋白质聚集在一起成为功能单元,例如在电子传递中所涉及的体系. 电子传递过程通过从膜的一边到另一边的质子输运的媒介,与 ATP 合成偶联,这是生物能量学研究的中心任务, 多年来一直在大力研究 (Cross, 1981; Wikstrom 等, 1981). 正在弄清楚, 细胞内存在着复杂的结构蛋白的阵列, 它们帮助保持细胞的形状,并且在特殊的细胞, 例如肌肉(已有较好的了解)中,使运动得以发生. 在这样一些领域中, 由化学提供的支撑较早期研究的概念框架似乎不那么牢靠了.

在生物化学的另一边缘更宽广的生物学领域中，不同物种之间蛋白质结构与功能的关联已经在进化和分化领域中拓宽了视野(Dickerson, 1980). 在蛋白质中不仅可以辨认出功能族系，也可以辨认出结构族系 (Rossman 和 Argos, 1981). 这些比较在进化论和分类学上的意义,一直鼓舞着整个生物学.

这或许是用来结束本章的一个适合的例子. 我们已经看到化学、物理和生物学的方法与思想在酶研究中融合了. 这一融合产生的辐射正在渗入许多研究领域，不仅是像本书所已充分展示的一些化学领域,而且是渗入生物学以至整个自然科学.

参 考 文 献

第一章

Anon. (1839) *Annal. Pharm.*, **29**, 100.
Fischer, E. (1894) *Chem. Ber.*, **27**, 2985.
Fischer, E. and Slimmer, M. (1903) *Chem. Ber.*, **36**, 2575.
Hoesch, K. (1921) *Chem. Ber.*, **54**, 375.
Robinson, R. (1917) *J. Chem. Soc.*, 762.
Robinson, R. (1974) *Tetrahedron*, **30**, 1477.
Sumner, J. B. (1926) *J. Biol. Chem.*, **69**, 435.
Tigerstedt, R. and Bergmann, P. B. (1898) *Skand. Arch. Physiol.*, **8**, 223.

第二章

Abeles, R. H. and Maycock (1976) *Acc. Chem. Res.*, **9**, 313.
Albery, W. J. and Knowles, J. R. (1977) *Acc. Chem. Res.*, **10**, 105.
Aldersley, M. F., Kirby, A. J. and Lancaster, P. W. (1972) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 570.
Bell, R. P. (1973) *The Proton in Chemistry*, 2nd edn., Cornell University Press, Ithaca, New York.
Bender, M. L. (1957) *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 1258.
Bender, M. L. (1971) *Mechanisms of Homogeneous Catalysis from Protons to Proteins*, Wiley Interscience, New York.
Bender, M. L., Chow, Y. and Chloupek, F. (1958) *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 5380.
Benner, S. A., Rozzell, J. D., Jr. and Morton, T. H. (1981) *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 993.
Bernasconi, C. F., Hibdon, S. A. and McMurry, S. E. (1982) *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 3459.
Breslow, R. (1962) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **98**, 445.
Breslow, R. and Wernick, D. (1976) *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 259.
Breslow, R., Czarniecki, M. F., Emert, J. and Hamaguchi, H. (1980) *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 762.
Bruice, T. C. (1970) *The Enzymes*, **2**, 217.
Bruice, T. C. and Benkovic, S. J. (1966) *Bioorganic Mechanisms*, W. A. Benjamin, New York.

Byers, L. D. (1978) *J. Theor. Biol.*, **74**, 501.
Cardinale, G. J. and Abeles, R. H. (1968) *Biochemistry*, **7**, 3970.
Cunningham, E. B. (1978) *Biochemistry*, McGraw-Hill, New York.
Curtin, D. Y. (1954) *Rec. Chem. Prog.*, **15**, 111.
Denbigh, K. (1964) *The Principles of Chemical Equilibrium*, Cambridge University Press, Cambridge.
Dunathan, H. C. (1966) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **55**, 712.
Dunathan, H. C. (1967) *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, **35**, 79.
Eigen, M. (1964) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **3**, 1.
Eliel, E. (1963) in *Stereochemistry of Carbon Compounds*, McGraw-Hill, New York, pp. 149–156.

Eliel, E. (1980) *J. Chem. Ed.*, **57**, 52.
Fersht, A. R. (1977) *Enzyme Structure and Mechanism*, W. H. Freeman and Co., San Francisco.
Gutowski, J. A. and Lienhard, G. E. (1976) *J. Biol. Chem.*, **251**, 2863.
Hall, A. and Knowles, J. R. (1975) *Biochemistry*, **14**, 4348.
Hammett, L. P. (1970) *Physical Organic Chemistry*, McGraw-Hill, New York.
Hammons, G., Westheimer, F. H., Nakaoka, K. and Kluger, R. (1975) *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 1568 and 4152.
Hanson, K. and Rose, I. A. (1975) *Acc. Chem. Res.*, **8**, 1.
Huber, C. P., Ozaki, Y., Pliura, D. H., Carey, P. R. and Storer, A. C. (1982) *Biochemistry*, **21**, 3109.
Ingold, C. K. (1953) *Structure and Mechanism in Organic Chemistry*, Cornell University Press, Ithaca, New York.
Jencks, W. P. (1969) *Catalysis in Chemistry and Enzymology*, McGraw-Hill, New York.
Jencks, W. P. (1975) *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, **43**, 219.
Jencks, W. P. (1980) *Acc. Chem. Res.*, **13**, 161.
Kirby, A. J. (1980) *Adv. Phys. Org. Chem.*, **17**, 183.
Kirby, A. J. and Lancaster, P. W. (1972) *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **2**, 1206.
Klotz, I. M. (1976) *J. Chem. Ed.*, **53**, 159.
Kluger, R. (1982) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **378**, 63.
Kluger, R. and Adawadkar, P. D. (1976) *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 3741.
Kluger, R. and Chin, J. (1982) *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 2891.
Kluger, R. and Nakaoka, K. (1974) *Biochemistry*, **13**, 910.
Kluger, R. and Smyth, T. (1981) *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 214.
Kluger, R., Davis, P. P. and Adawadkar, P. D. (1979) *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 5995.
Krampitz, L. O. (1970) *Thiamin Diphosphate and its Catalytic Functions*, Marcel Dekker, New York.
Krampitz, L. O., Suzuki, I. and Greull, G. (1961) *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, **20**, 971.
Lienhard, G. E. (1973) *Science*, **180**, 149.
MacInnes, I., Neshebel, D. C., Orszulik, S. T. and Suckling, C. J. (1982) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **121**, 1146.
MacNeil, P. A., Roberts, N. K. and Bosnich, B. (1981) *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 2273.
Metzler, D. E. (1977) *Biochemistry*, Academic Press, New York.
Murdoch, J. R. (1981) *J. Chem. Ed.*, **58**, 32.
O'Leary, M. H. and Baughn, R. L. (1972) *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 626.
Page, M. I. and Jencks, W. P. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 1678.
Ritchie, C. D. (1969) in *Solute–Solvent Interactions*, Vol. 1 (eds J. F. Coetzee and C. D. Ritchie), Marcel Dekker, New York.
Schowen, R. L. (1977) in *Isotope Effects on Enzyme-Catalyzed Reactions* (eds W. W Cleland, M. H. O'Leary and D. B. Northrop), University Park Press, Baltimore, pp. 64–99.
Scrimgeour, K. G. (1977) *Chemistry and Control of Enzyme Reactions*, Academic Press, London.
Segel, I. H. (1975) *Enzyme Kinetics*, John Wiley and Sons, New York.
Tabushi, I. (1982) in *Frontiers of Chemistry* (ed. K. J. Laidler), Pergamon Press, Oxford, pp. 275–286.
Tagaki, W. and Westheimer, F. H. (1968) *Biochemistry*, **7**, 891.
Turano, A., Furey, W., Pletcher, J., Sax, M., Pike, D. and Kluger, R. (1982) *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 3089.

van Etten, R. L., Sebastian, J. F., Clowes, G. A. and Bender, M. L. (1967) *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 3242.
Walsh, C. (1979) *Enzymatic Reaction Mechanisms*, W. H. Freeman and Co., San Francisco.
Westheimer, F. H. (1956) *Adv. Enzymol. Relat. Subj. Biochem.*, **24**, **441**.
Westheimer, F. H. (1969) *Methods Enzymol.*, 14, 231.
Wittorf, J. H. and Gubler, C. J. (1970) *Eur. J. Biochem.*, **14**, 53.
Wolfenden, R. V. (1972) *Acc. Chem. Res.*, **5**, 10.
Wolfenden, R. V. (1974) *Mol. Cell. Biochem.*, 3, 207.
Wolfenden, R. V. (1979) *FEBS Symp.*, **57**, 151.
Wood, H. G. and Barden, R. E. (1977) *Annu. Rev. Biochem.*, **46**, 385.

第三章

Abeles, R. H., Hutton, R. F. and Westheimer, F. H. (1957) *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 712.
Adams, M. J., Buehner, M., Chandrasekhar, K., Ford, G. C., Hockert, M. L., LiLjas, A., Rossman, M. G., Smiley, I. E., Allison, S., Evarse, J., Kaplan, N. O. and Taylor, S. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 1968.
Ball, S. and Bruice, T. C. (1980) *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 6498.
Bamberg, P. and Hemmerich, P. (1961) *Helv. Chim. Acta*, **44**, 1001.
Behr, J.-P. and Lehn, J.-M. (1978) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 143.
Belokon, Y. N., Tararov, V. I., Saveleva, T. F. and Belikov. V. M. (1980) *Makromol. Chem.*, **181**, 2183.
Breslow, R. (1958) *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 3719.
Breslow, R., Hammond, M. and Lauer, M. (1980) *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 421.
Brown, L. E. and Hamilton, G. A. (1970) *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 7225.
Bruice, T. C. (1980) *Acc. Chem. Res.*, **13**, 256.
Bruice, T. C. and Benkovic, S. J. (1966) *Bioorganic mechanisms*, Vol. 2, Benjamin, New York, Chapter 9.
Bruice, T. C., Chan, T. W., Taulane, J. P., Yokoe, I., Elliot, D. L., Williams, R. F. and Novak, M. (1977) *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 6713.
Buckley, T. F. and Rapoport, H. (1982) *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 4446.
Bunton, C. A., Minch, M. J., Hidalgo, J. and Sepulveda, L. (1973) *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 3262.
Bunton, C. A., Rivera, F. and Sepulveda, L. (1978) *J. Org. Chem.*, **43**, 1166.
Castells, J., Llitjos, H. and Moreno-Manas, M. (1977) *Tetrahedron Lett.*, 205.
Castells, J., Dunach, E., Geijo, F., Pujol, F. and Segura, P. M. (1978) *Isr. J. Chem.*, **17**, 278.
Cheeseman, P., Toms-Wood, A. and Wolfe, R. S. (1972) *J. Bacteriol.*, **112**, 527.
Christen, P. and Gasser, A. (1980) *Eur. J. Biochem.*, **107**, 73.
Clarke, M. J., Dowling, M. G., Garafalo, A. R. and Brennan, T. F. (1979) *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 223.
Cogoli-Greuter, M., Hausner, U. and Christen, P. (1979) *Eur. J. Biochem.*, **100**, 295.
Cookson, R. C. and Lane, R. M. (1976) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 804.
Corbett, M. D. and Chipko, B. R. (1980) *Bioorg. Chem.*, **9**, 273.
Creighton, D. J. and Sigman, D. S. (1971) *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 6314.
Crosby, J., Stone, R. and Lienhard, G. E. (1970) *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 2891.
Daigo, K. and Reed, L. J. (1962) *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 659.
Damen, J. and Neckers, D. C. (1980) *Tetrahedron Lett.*, 1913.

de Vries, J. G. and Kellog, R. M. (1979) *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 2759.
Dittmer, D. C. and Fouty, R. A. (1964) *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 91.
Douglas, K. T. and Nadvi, I. N. (1979) *FEBS Lett.*, **106**, 393.
Edmondson, D. E., Barman, B. and Tollin, G. (1972) *Biochemistry*, **11**, 1133.
Endo, T., Hayashi, Y. and Okawara, M. (1977) *Chem. Lett.*, 392.
Franzen, V. (1955) *Chem. Ber.*, **88**, 1361.
Franzen, V. and Fikentscher, L. (1958) *Liebigs. Ann. Chem.*, **613**, 1.
Fritchie, C. J., Jr. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 7459.
Frost, J. W. and Rastetter, W. H. (1981) *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 5242.
Gascoigne, I. M. and Radda, G. K. (1967) *Biochim. Biophys. Acta*, **131**, 498.
Gase, R. A. and Pandit, U. K. (1977) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 480.
Gase, R. A., Boxhoon, G. and Pandit, U. K. (1976) *Tetrahedron Lett.*, 2889.
Gibian, M. J. and Baumstark, A. L. (1971) *J. Org. Chem.*, **36**, 1389.
Gibian, M. J. and Rynd, J. A. (1969) *Biochem. Biphys. Res. Commun.*, **34**, 594.
Gibian, M. J. and Winkelman, D. W. (1969) *Tetrahedron Lett.*, 3901.
Gumbley, S. J. and Main, L. (1976) *Tetrahedron Lett.*, 3209.
Hadju, J. and Sigman, D. S. (1975) *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 3524.
Hadju, J. and Sigman, D. S. (1977) *Biochemistry*, **16**, 2841.
Hall, S. S., Doweyko, A. M. and Jordan, F. (1978) *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 5934.
Hastings, J. W., Balny, C., Le Peuch, C. and Douzou, P. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 3468.
Heggs, R. P. and Ganem, B. (1979) *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 2484.
Hemmerich, P., Nagelschneider, G. and Veeger, C. (1970) *FEBS Lett.*, **8**, 69.
Hemmerich, P. Massey, V. and Fenner, H. (1977) *FEBS Lett.*, **84**, 5.
Inoue, H. and Higashiura, K. (1980) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 549.
Inoue, H., Aoki, R. and Imoto, E. (1974) *Chem. Lett.*, 1157.
Iwata, M., Kuzuhara, H. and Emoto, S. (1976) *Chem. Lett.*, 983.
Jencks, W. P. (1969) *Catalysis in Chemistry and Enzymology*, McGraw-Hill, New York.
Jones, J. B. and Beck, J. F. (1976) in *Application of Biochemical Systems in Organic Chemistry* (eds J. B. Jones, C. J. Sih and D. Perlman), John Wiley & Sons, New York, pp. 107–401.
Kalyankar, G. D. and Snell, E. E. (1962) *Biochemistry*, **1**, 594.
Kemal, C. and Bruice, T. C. (1976a) *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 3955.
Kemal, C. and Bruice, T. C. (1976b) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 995.
Kemal, C. and Bruice, T. C. (1977) *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 7064.
Kemal, C. and Bruice, T. C. (1979) *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 1635.
Kemal, C., Chan, T. W. and Bruice, T. C. (1977) *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 7272.
Kemp, D. S. and Paul, K. G. (1970) *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 2553.
Kill, R. J. and Widdowson, D. A. (1976) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 755.
Kill, R. J. and Widdowson, D. A. (1978) in *Bioorganic Chemistry*, Vol. 4 (ed. E. E. van Tamelen), Academic Press, New York, pp. 239–275.
Kluger, R. and Pike, D. C. (1979) *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 6425.
Kluger, R., Chin, J. and Smyth, T. (1981) *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 884.
Knappe, W.-R. (1979) *Liebigs Ann. Chem.*, 1067.
Kojima, M., Toda, F. and Hattori, K. (1981) *J. Chem. Soc., Perkin Trans I*, 1647.
Kosman, D. J. (1977) in *Bioorganic Chemistry*, Vol. 2 (ed. E. E. van Tamelen), Academic Press, New York, pp. 175–195.
Kozarich, J. W., Chari, R. V. J., Wu, J. C. and Lawrence, T. L. (1981) *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 4953

Kunitake, T. and Shinkai, S. (1980) *Adv. Phys. Org. Chem.*, **17**, 435.
Kuzuhara, H., Iwata, M. and Emoto, S. (1977) *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 4173.
Kuzuhara, H., Komatsu, T. and Emoto, S. (1978) *Tetrahedron Lett.*, 3563.
Llor, J. and Cortijo, M. (1977) *J. Chem. Soc., Perkin Trans 2*, 1111.
Loechler, E. L. and Hollocher, T. C. (1975) *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 3235.
MacInnes, I., Nenhebel, D. C., Orszulik, S. T. and Suckling, C. J. (1982) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **121**, 1146.
Main, L., Dasperek, G. J. and Bruice, T. C. (1972) *Biochemistry*, **11**, 3991.
Makino, T., Nunozawa, T., Baba, N. Oda, J. and Inoue, Y. (1979) *Tetrahedron Lett.*, 1683.
McCapra, F. and Lesson, P. (1976) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1037.
Metzler, D. E., Ikawa, M. and Snell, E. E. (1954) *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 648.
Miller, A. (1982) *Tetrahedron Lett.*, **23**, 753.
Moras, D., Olsen, K. W., Sabesan, M. N., Buehner, M., Ford, G. C. and Rossman, M. G. (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 9137.
Murakami, Y. and Kondo, H. (1975) *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **48**, 541.
Murakami, Y., Aoyama, Y. and Kikuchi, J. (1981a) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 444.
Murakami, Y., Aoyama, Y. and Kikuchi, J. (1981b) *J. Chem. Soc., Perkin Trans, 1*, 2809.
Muto, S. and Bruice, T. C. (1980) *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 7559.
Nakano, H., Nishioka, M., Sangen, O. and Yamamoto, Y. (1981) *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.*, **19**, 2919.
Nambu, Y., Endo, T. and Okawara, M. (1980) *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.*, **18**, 2793.
Nambu, Y., Endo, T. and Okawara, M. (1981) *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.*, **19**, 1937.
Nishide, H., Deguchi, J. and Tsuchida, E. (1976) *Chem. Lett.*, 169.
Nishiyama, K., Baba, N., Oda, J. and Inoue, Y. (1976) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 101.
Oae, S., Tagaki, W. and Ohno, A. (1961) *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 5036.
O'Brien, D. E., Weinstock, L. T. and Cheng, C. C. (1970) *J. Heterocyclic Chem.*, **7**, 99.
Ohnishi, Y. and Kitami, M. (1978) *Tetrahedron Lett.*, 4035.
Ohnishi, Y., Kagami, M. and Ohno, A. (1975a) *Tetrahedron Lett.*, 2437.
Ohnishi, Y., Kagami, M. and Ohno, A. (1975b) *Chem. Lett.*, 125.
Ohnishi, Y., Kagami, M. and Ohno, A. (1975c) *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 4766.
Ohnishi, Y., Kagami, M., Numakunai, T. and Ohno, A. (1976) *Chem. Lett.*, 915.
Ohno, A., Ikeguchi, M., Kimura, T. and Oka, S. (1979) *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 7063.
Ohno, A., Yasui, S., Gase, R. A., Oka, S. and Pandit, U. K. (1980) *Bioorg. Chem.*, **9**, 199.
Ono, N., Tamura, R. and Kaji, A. (1980) *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 2851.
Ono, N., Tamura, R., Tanikaga, R. and Kaji, A. (1981) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 71.
Pac, C., Ihama, M., Yasuda, M., Miyauchi, Y. and Sakurai, H. (1981) *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 5495.
Pandit, U. K. and Mas Cabré, F. R. (1971) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 552.
Pattison, S. E. and Dunn, M. F. (1976) *Biochemistry*, **15**, 3691.
Racker, E. (1951) *J. Biol. Chem.*, **190**, 685.

Rastetter, W. H. and Adams, J. (1981) *J. Org. Chem.*, **46**, 1882.
Rastetter, W. H., Gadek, T. R., Tane, J. P. and Frost, J. W. (1979) *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 2228.
Rynd, J. A. and Gibian, M. J. (1970) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **41**, 1097.
Seki, M., Baba, N., Oda, J. and Inoue, Y. (1981) *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 4613.
Selbin, J., Sherrill, J. and Bigger, C. H. (1974) *Inorg. Chem.*, **13**, 2544.
Shea, K. J., Thompson, E. A., Pandey, S. D. and Beauchamp, P. S. (1980) *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 3149.
Sheehan, J. C. and Hara, T. (1974) *J. Org. Chem.*, **39**, 1196.
Shinkai, S. (1982) *Prog. Polym. Sci.*, **8**, 1.
Shinkai, S. and Bruice, T. C. (1973a) *Biochemistry*, **12**, 1750.
Shinkai, S. and Bruice, T. C. (1973b) *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 7526.
Shinkai, S. and Kunitake, T. (1977) *Chem. Lett.*, 297.
Shinkai, S., Kunitake, T. and Bruice, T. C. (1974) *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 7140.
Shinkai, S., Ando, R. and Kunitake, T. (1975) *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **48**, 1914.
Shinkai, S., Shiraishi, S. and Kunitake, T. (1976a) *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **49**, 3656.
Shinkai, S., Ando, R. and Kunitake, T. (1976b) *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **49**, 3652.
Shinkai, S., Hamada, H., Ide, T. and Manabe, O. (1978a) *Chem. Lett.*, 685.
Shinkai, S., Ide, T. and Manabe, O. (1978b) *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **51**, 3655.
Shinkai, S., Yamada , S. and Kunitake, T. (1978c) *J. Polym. Sci., Polym. Lett. Ed.*, **16**, 137.
Shinkai, S., Ando, R. and Kunitake, T. (1978d) *Biopolymers*, **17**, 2757.
Shinkai, S., Yamada, S. and Kunitake, T. (1978e) *Macromolecules*, **11**, 65.
Shinkai, S., Hamada, H., Kusano, Y. and Manabe, O. (1979a) *Bull. Chem. Soc. Jpn* **52**, 2600.
Shinkai, S., Hamada, H., Kusano, Y. and Manabe, O. (1979b) *J. Chem. Soc., Perki Trans, 2*, 699.
Shinkai, S., Hamada, H. and Manabe, O. (1979c) *Tetrahedron Lett.*, 1397.
Shinkai, S., Hamada, H., Kusano, Y. and Manabe, O. (1979d) *Tetrahedron Lett.*, 3511.
Shinkai, S., Nakano, T., Hamada, H., Kusano, Y., and Manabe, O. (1979e) *Chem. Lett.*, 229.
Shinkai, S., Mori, K., Kusano, Y. and Manabe, O. (1979f) *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **52**, 3606.
Shinkai, S., Hamada, H., Dohyama, A. and Manabe, O. (1980a) *Tetrahedron Lett.*, 1661
Shinkai, S., Kusano, Y., Manabe, O. and Yoneda, F. (1980b) *J. Chem. Soc., Perkin Trans 2*, 1111.
Shinkai, S., Yamashita, T., Kusano, Y., Ide, T. and Manabe, O. (1980c) *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 2335.
Shinkai, S., Yamashita, T., Kusano, Y. and Manabe, O. (1980d) *Tetrahedron Lett.*, **21**, 2543.
Shinkai, S., Yamashita, T., Kusano, Y. and Manabe, O. (1980e) *J. Org. Chem.*, **45**, 4947.
Shinkai, S., Hamada, H., Kuroda, H. and Manabe, O. (1981a) *J. Org. Chem.*, **46**, 2333.
Shinkai, S., Yamashita, T., Kusano, Y. and Manabe, O. (1981b) *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 2070.
Shinkai, S., Ishikawa, Y. and Manabe, O. (1982a) *Chem. Lett.*, 809.
Shinkai, S., Yamashita, T., Kusano, Y. and Manabe, O. (1982b) *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 563.

Shinkai, S., Hara, Y. and Manabe, O. (1982c) *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.*, **20**, 1097.
Shinkai, S., Ishikawa, Y. and Manabe, O. (1983) *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **56**, 1964.
Shirra, A. and Suckling, C. J. (1977) *J. Chem. Soc., Perkin Trans, 2*, 759.
Sigman, D. S., Hadju, J. and Creighton, D. J. (1978) in *Bioorganic Chemistry*, Vol. 4 (ed. E. E. van Tamelen), Academic Press, New York, pp. 385–407.
Spencer, R., Fisher, J. and Walsh, C. (1977) *Biochemistry*, **16**, 3586.
Spetnagel, W. J. and Klotz, I. M. (1978) *Biopolymers*, **17**, 1657.
Steffens, J. J. and Chipman, D. M. (1971) *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 6694.
Stetter, H. and Kuhlmann (1976) *Chem. Ber.*, **109**, 2890.
Stetter, H., Basse, W. and Nienhaus, J. (1980) *Chem. Ber.*, **113**, 690.
Tagaki, W. and Hara, H. (1973) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 891.
Tagaki, W., Tamura, Y. and Yano, Y. (1980) *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **53**, 478.
Takagi, M. Goto, S., Ishihara, R. and Matsuda, T. (1976) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 993.
Takagi, M., Goto, S., Tazaki, M. and Matsuda, T. (1980) *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **53**, 1982.
van Bergen, T. J. and Kellog, R. M. (1977) *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 3882.
van Eikeren, P. and Grier, D. L. (1976) *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 4655.
van Ramesdonk, H. J., Verhoeven, J. W., Pandit, U. K. and de Boer, Th. J. (1978) *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas.*, **97**, 195.
Wallenfels, K. and Hanstein, W. (1965) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 869.
Wallenfels, K., Ertel, W. and Friedrich, K. (1973) *Liebigs Ann. Chem.*, 1663.
Walsh, C. (1980) *Acc. Chem. Res.*, **13**, 148.
Walsh, C., Schonbrunn, A. and Abeles, R. H. (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 6855.
Walsh, C., Fisher, J., Spencer, R., Graham, D. W., Ashton, W. T., Brown, J. E., Brown, R. D. and Rogers, E. F. (1978) *Biochemistry*, **17**, 1942.
White, F. G. and Ingraham, L. L. (1962) *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 3109.

Williams, R. F. and Bruice, T. C. (1976) *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 7752.
Wilson, G. E., Jr. and Hess, A. (1980) *J. Org. Chem.*, **45**, 2766.
Wulff, G., Vesper, W., Grode-Einsler, R. and Sarhan, A. (1977) *Makromol. Chem.*, **178**, 2799.
Yaggi, N. F. and Douglas, K. T. (1977) *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 4844.
Yano, Y., Hoshino, Y. and Tagaki, W. (1980) *Chem. Lett.*, 749,
Yokoe, I. and Bruice, T. C. (1975) *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 450.
Yoneda, F. and Nakagawa, K. (1980) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 878.
Yoneda, F., Sakuma, Y. and Hemmerich, P. (1977) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 825.
Yoneda, F., Kawazoe, M. and Sakuma, Y. (1978a) *Tetrahedron Lett.*, 2803.
Yoneda, F., Sakuma, Y. and Nitta, Y. (1978b) *Chem. Lett.*, 1177.
Yoneda, F., Hirayama, R. and Yamashita, M. (1980a) *Chem. Lett.*, 1157.
Yoneda, F., Ono, M., Kira, K., Tanaka, H., Sakuma, Y. and Koshiro, A. (1980b) *Chem. Lett.*, 817.
Yoneda, F., Yamato, H. and Ono, M. (1981) *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 5943.

第四章

Baldwin, J. E., Loliger, J., Rastetter, W., Neuss, N, Huckstep, L. L. and de la Higuera, N. (1973) *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 3796.
Barrett, A. G. M., Lana, J. C. A. and Tograie, S. (1980) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 300.

Battersby, A. R. and Staunton, J. (1974) *Tetrahedron*, **30**, 1707
Battersby, A. R., Staunton, J. and Wiltshire, H. R. (1975) *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1**, 1156.
Becker, W., Freund, H. and Pfeil, E. (1965) *Angew. Chem.*, **77**, 1139.
Breslow, R. (1972) *Chem. Soc. Rev.*, **1**, 553.
Breslow, R. (1980) *Acc. Chem. Res.*, **13**, 170.
Breslow, R. and Heyer, D. (1982) *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 2045.
Breslow, R., Hammond, M. and Lauer, M. (1980) *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 421.
Brown, J. M. (1980) in *Enzymic and Non-enzymic Catalysis* (eds P. Dunnil, A. Wiseman and N. Blakebrough), Ellis and Horwood, Chichester, p. 120.
Bunton, C. A. (1976) in *Applications of Biochemical Systems in Organic Chemistry, Techniques of Organic Chemistry Series* (eds J. B. Jones, C. J. Sih and D. Perlman), Wiley Interscience, New York, Vol. 2, p. 731.
Caldwell, A. G., Harris, C. J., Stepney, R. and Whittaker, N. (1979) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 561.
Chen, C-S., Fujimoto, Y. and Sih, C. J. (1981) *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 3580.
Chibata, I. (ed.) (1978) *Immobilised Enzymes*, Halsted Press for Kodanasha, New York.
Corey, E. J., Becker, K. B. and Varma, R. K. (1972) *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 8616.
Cram, D. J. (1976) in *Applications of Biochemical Systems in Organic Chemistry, Techniques of Organic Chemistry Series* (eds J. B. Jones, C. J. Sih and D. Perlman), Wiley Interscience, New York, Vol. 2, p. 815.
Cram, D. J. and Sogah, G. D. Y. (1981) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 625.
Deol, B. S., Ridley, D. D. and Simpson, G. W. (1976) *Aust. J. Chem.*, **29**, 2459.
DiCosimo, R., Wong, C.-H., Daniels, L. and Whitesides, G. M. (1981) *J. Org. Chem.*, **46**, 4622.
Dodds, D. R. and Jones, J. B. (1982) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1080.
Fleming, I. (1973) *Selected Organic Syntheses*, Wiley, London, p. 36.
Fronza, G., Fuganti, C. and Graselli, P. (1980) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 442.
Fuganti, C. and Graselli, P. (1979) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 995.
Fuganti, C. and Graselli, P. (1982) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 205.
Guthrie, J. P. (1976) in *Applications of Biochemical Systems in Organic Chemistry, Techniques of Organic Chemistry Series* (eds J. B. Jones, C. J. Sih and D. Perlman), Wiley Interscience, New York, Vol. 2, p. 627.
Hill, R. L. and Teipel, J. W. (1971) in *The Enzymes* 3rd edn (ed. P. D. Boyer), Academic Press, New York, Vol. 5, p. 556.
Hirschbein, B. L. and Whitesides, G. M. (1982) *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 4458.
Iguchi, S. Nakai, H., Hayashi, M. and Yamamoto, H. (1979) *J. Org. Chem.*, **44**,
Jones, J. B. (1980) in *Enzymic and Nonenzymic Catalysis* (eds P. Dunnil, A. Wiseman and N. Blakebrough), Ellis and Horwood, Chichester, p. 54.
Jones, J. B. and Beck, J. F. (1976) in *Applications of Biochemical Systems in Organic Chemistry, Techniques of Organic Chemistry Series* (eds J. B. Jones, C. J. Sih and D. Perlman), Wiley Interscience, New York, p. 107.
Jones, J. B. and Davies, J. (1981) *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 5405.
Jones, J. B. and Jakovac, I. J. (1982) *Can. J. Chem.*, **60**, 19.
Jones, J. B. and Lok, K. P. (1979) *Can. J. Chem.*, **57**, 2533.
Jones, J. B. and Schwartz, H. M. (1981) *Can. J. Chem.*, **59**, 1574.
Jones, J. B. and Schwartz, H. M. (1982) *Can. J. Chem.*, **60**, 1030.

Jones, J. B. and Taylor, K. E. (1976) *Can. J. Chem.*, **54**, 2969; *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 5689.
Jones, J. B., Finch, M. A. W. and Jakovac, I. J. (1982) *Can. J. Chem.*, **60**, 2007.
Jones, J. B., Sih, C. J. and Perlman, D. (eds) (1976) *Applications of Biochemical Systems in Organic Chemistry, Techniques of Organic Chemistry Series*, Wiley Interscience, New York.
Julia, S., Masana, J. and Vega, J. C. (1980) *Angew. Chem. Int. Edn. Engl.*, **19**, 929.
Kawai, K.-I., Imuta, M. and Ziffer, H. (1981) *Tetrahedron Lett.*, **22**, 2527.
Klibanov, A. M., Berman, Z., and Alberti, B. N. (1981) *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 6263.
Kluender, H., Huang, F.-C., Fritzberg, A., Schnoes, H., Sih, C. J., Fawcett, P. and Abraham, E. P. (1973) *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 6149.
Krishnamurthy, S. (1974) *Aldrichim. Acta*, **7**, 55.
Krishnamurthy, S. (1981) *J. Org. Chem.*, **46**, 4629.
Leuchs, H.-J., Lewis, J. M., Rios-Mercadillo, V. M. and Whitesides, G. M. (1979) *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 5830.
Lewis, J. M., Haynie, S. L. and Whitesides, G. M. (1979) *J. Org. Chem.*, **44**, 864.
Link, C. M., Jansen, D. K. and Sukenik, C. N. (1980) *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 7798.
Menger, F. M. (1979) *Acc. Chem. Res.*, **12**, 111.
Menger, F. M., Takeshita, M. and Chow, J. F. (1981) *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 5938.
Midland, M. M., Tramontano, A. Zderic, S. A. and Greer, S. (1979) *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 2352.
Mosbach, K. and Larsson, P. M. (1970) *Biotechnol. Bioeng.*, **12**, 19.
Neidlemann, S. L., Amon, W. F., Jr. and Geigert (1981) *US Patent* 4 247 641, *Chem. Abstr.*, **94**, 190 337.
Norman, R. O. C. (1982) in *The Chemical Industry* (eds D. Sharp and T. F. West), Ellis and Horwood, Chichester, p. 347.
Noyori, R. Tomino, I. and Tanimoto, Y. (1979) *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 3129, 5843.
Oku, J. and Inoue, S. (1981) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 229.
Onyiriuka, S. O. and Suckling, C. J. (1982) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 833.
Perlman, D. (1976) in *Applications of Biological Systems to Organic Chemistry, Techniques of Organic Chemistry Series* (eds J. B. Jones, C. J. Sih and D. Perlman), Wiley Interscience, New York, Vol. 1, p 47.
Pollak, A., Baughn, R. L., Adalstensson, O. and Whitesides, G. M. (1978) *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 304.
Pollak, A., Baughn, R. L. and Whitesides, G. M. (1977) *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 2366.
Prelog, V. (1964) *Pure. Appl. Chem.*, **9**, 126.
Reid, T. W., Stein, T. P. and Fahrney, D. (1967) *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 7125.
Rideout, D. C. and Breslow, R. (1980) *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 7816.
Ruddleston, J. F. and Stewart, A. (1981) *J. Chem. Res. (S)*, 378.
Scott, A. I. (1976) in *Applications of Biochemical Systems in Organic Chemistry, Techniques of Organic Chemistry Series* (eds J. B. Jones, C. J. Sih and D. Perlman), Wiley Interscience, New York, Vol. 2, p. 555.
Sharpless, K. B. and Verhoeven, T. R. (1979) *Aldrichim. Acta.*, **13**, 13.
Sih, C. J. and Rosazza, J. P. (1976) in *Applications of Biochemical Systems to Organic Chemistry, Techniques in Organic Chemistry Series* (eds J. B. Jones, C. J. Sih and D. Perlman), Wiley Interscience, New York, Vol. 1, p. 69.
Sih, C. J., Heather, H. B., Sood, R., Price, P., Peruzzotti, B., Hsu-Lee, L. F. and Lee, S. S. (1975) *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 865.
Simon, H., Gunther, H., Bader, J. and Tischer, W. (1981) *Angew. Chem. Int. Edn. Engl.*, **20**, 861.

Slama, J. T., Oruganti, S. R. and Kaiser, E. T. (1981) *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 6211.
Suckling, C. J. (1977) *Chem. Soc. Rev.*, **7**, 215.
Suckling, C. J. (1981) *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.*, **20**, 434.
Suckling, C. J. (1982) *J. Chem. Soc., Chem. Commun*, 661.
Suckling, C. J. and Suckling, K. E. (1974) *Chem. Soc. Rev.*, **4**, 387.
Suckling, C. J., Suckling, C. W. and Suckling, K. E. (1978) *Chemistry through Models*, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 203–210.
Sutherland, I. O. (1982) in *The Chemical Industry* (eds D. Sharp and T. F. West), Ellis and Horwood, Chichester, p. 421.
Szabo, W. A. and Lee, S. S. (1975) *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 865.
Szajewski, R. P. and Whitesides, G. M. (1980) *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 2011.
Tabushi, I. (1982) *Acc. Chem. Res.*, **15**, 66.
Tabushi, I., Yamamura, K., Fujita, K. and Kawakubo, H. (1979) *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 1019.
Trost, B. M. and Klun, T. P. (1979) *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 6756.
Trost, B. M. and Klun, T. P. (1981) *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 1864.
Whitesides, G. M. (1976) in *Applications of Biochemical Systems in Organic Chemistry, Techniques of Organic Chemistry Series* (eds J. B. Jones, C. J. Sih and D. Perlman), Wiley Interscience, New York, Vol. 2, Chapter 7.
Whitlock, H. W., Jr. (1976) in *Applications of Biochemical Systems in Organic Chemistry, Techniques of Organic Chemistry Series* (eds J. B. Jones, C. J. Sih and D. Perlman), Wiley Interscience, New York, Vol. 2, p. 1045.
Wilson, M. E. and Whitesides, G. M. (1978) *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 305.
Wong, C.-H. and Whitesides, G. M. (1981) *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 4890.
Wynberg, H. and Marsmann, B. (1980) *J. Org. Chem.*, **45**, 158.

第五章

Abeles, R. H. and Maycock, A. L. (1976) *Acc. Chem. Res.*, **9**, 313.
Alberts, A. W., Chen, J., Kuron, G., Hunt, V., Huff, J., Hoffman, C., Rothrock, J., Lopez, M., Joshua, H., Harris, E., Patchett, A., Monaghan, R., Currie, S., Stapley, E., Albers-Schonberg, G., Hensens, O., Hirschfield, J., Hoogsteen, K., Liesch, J. and Springer, J. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**, 3957.
Albery, W. J. and Knowles, J. R. (1977) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **16**, 285.
Appleton, R. A. and Brown, K. (1979) *Prostaglandins*, **18**, 29.
Armarego, W. L. F., Waring, P. and Williams, J. W. (1980) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 334.
Baker, D. J., Beddell, C. R., Champness, J. N., Goodford, P. J., Norrington, F. E. A., Smith, D. R. and Stammers, D. K. (1981) *FEBS Lett.*, **126**, 49.
Blundell, T. L. and Johnson, L. N. (1976) *Protein Crystallography*, Academic Press, New York.
Bondinell, W. E., Chapin, F. W., Girard, G. R., Kaiser, C., Krog, A. J., Pavloff, A. M., Schwartz, M. S., Silvestri, J. S., Vaidya, P. D., Lam., B. L., Wellman, G. R. and Pendleton, R. G. (1980) *J. Med. Chem.*, **23**, 506.
Borgeat, P. and Sirois, P. (1981) *J. Med. Chem.*, **24**, 121.
Bott, R., Subramanian, E. and Davies, D. R. (1982) *Biochemistry*, **21**, 6956.
Brown, A. G. (1981) *J. Antimicrob. Chemother.*, **7**, 15.
Brown, M. S., Kovanen, P. T. and Goldstein, J. L. (1981) *Science*, **212**, 628.
Brown, W. E. and Rodwell, V. W. (1980) *Experientia Suppl.*, **36**, 232.
Burger, A. (1980) in *The Basis of Medicinal Chemistry, Part I*, 4th edn (ed. M. E. Wolff), John Wiley and Sons, New York, pp. 1–54.

Byers, L. D. and Wolfenden, R. (1973) *Biochemistry*, **12**, 2070.
Cocco, L., Groff, T. P., Temple, C., Jr., Montgomery, J. A., London, R. E., Matwiyoff, N. A. and Blakley, R. L. (1981) *Biochemistry*, **20**, 3972.
Cody, R. J., Burton, J., Evin, G., Poulsen, K., Herd, J. A. and Haber, E. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **97**, 230.
Cushman, D. W., Cheung, H. S., Sabo, E. F. and Ondetti, M. A. (1977) *Biochemistry*, **16**, 5484.
Easton, C. J. and Knowles, J. R. (1982) *Biochemistry*, **12(12)** 2857.
Endo, A. (1979) *J. Antibiot.*, **32**, 852.
Endo, A. (1981) *Trends Biochem. Sci.*, **6**, 10.
Endo, A., Kuroda, M. and Tsujita, Y. (1976) *J. Antibiot.*, **29**, 1346.
Fisher, J., Belasco, J. G., Charnas, R. L., Khosla, S. and Knowles, J. R. (1980) *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B*, **289**, 309.
Fontecilla-Camps, J. C., Bugg, C. E., Temple, C., Jr., Rose, J. D., Montgomery, J. A. and Kisliuk, R. L. (1979) *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 6114.
Frere, J.-M., Ghuysen, J.-M., Degelaen, J., Loffet, A. and Perkins, H. R. (1975) *Nature (London)*, **258**, 168.
Fuller, R. W. (1982) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **22**, 31.
Gund, P. and Shen, T. Y. (1977) *J. Med. Chem.*, **20**, 1146.
Hamberg, M. and Hamberg, G. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **95**, 1090.
Hitchings, G. H. and Roth, B. (1980) in *Enzyme Inhibitors as Drugs* (ed. M. Sandler), Macmillan, London, pp. 263–267.
Hitchings, G. H. and Smith, S. L. (1980) *Adv. Enzyme Regul.*, **18**, 349.
Hsu, I.-N., Delbaere, L. T. J. and James, M. N. G. (1977) *Nature (London)*, **266**, 140.
James, M. N. G., Hsu, I.-N. and Delbaere, L. T. J. (1977) *Nature (London)*, **267**, 808.
James, M. N. G., Hsu, I.-N., Hofmann, T. and Sielecki, A. R. (1981) in *Structural Studies of Molecular Biological Interest* (eds G. Dodson, J. P. Glusker and D. Sayre), Oxford University Press, London, pp. 350–389.
James, M. N. G., Sielecki, A., Salituro, F., Rich, D. H. and Hofmann, T. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**, 6137.
Jencks, W. P. (1980) in *Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics*, Vol. 32: *Chemical Recognition in Biology* (eds F. Chapeville and A.-L. Haenni), Springer-Verlag, Berlin, pp. 3–25.
Kelly, J. A., Moews, P. C., Knox, J. R., Frère, J.-M. and Ghuysen, J.-M. (1982) *Science*, **218**, 479.
Kleinsek, D. A., Dugan, R. E., Baker, T. A. and Porter, J. W. (1981) *Methods Enzymol.*, **71**, 462.
Knowles, J. R. (1982) in *Antibiotics*, Vol. VI: *Modes and Mechanisms of Microbial Growth Inhibition* (ed. F. E. Hahn), Springer Verlag, Berlin (in press).
Kuyper, L. F., Roth, B., Baccanari, D. P., Ferone, R., Beddell C. R., Champness, J. N., Stammers, D. K., Dann, J. G., Norrington, F. E. A., Baker, D. J. and Goodford, P. J. (1982) *J. Med. Chem.*, **25**, 1120.
Langridge, R., Ferrin, T. E., Kuntz, I. D. and Connolly, M. L. (1981) *Science*, **211**, 661.
Laragh, J. H. (1978) *Prog. Cardiovasc. Dis.*, **21**, 159.
Laughlin, R. C. and Carey, T. F. (1962) *J. Am. Med. Assoc.*, **181**, 339.
Lienhard, G. E. (1973) *Science*, **180**, 149.
Marciniszyn, J., Hartsuck, J. A. and Tang, J. (1976) *J. Biol. Chem.*, **251**, 7088.
Marquet, A., Frere, J.-M., Ghuysen, J.-M. and Loffet, A. (1979) *Biochem. J.*, **177**, 909.

Marshall, G. R. (1976) *Fed. Proc., Fed. Am Soc. Exp. Biol.*, **35**, 2494.
Matthews, D. A., Alden, R. A., Bolin, J. T., Filman, D. J., Freer, S. T., Hamlin, R., Hol, W. G.-J., Kisliuk, R. L., Pastore, E. J., Plante, L. T., Xuong, N.-L. and Kraut, J. (1978) *J. Biol. Chem.*, **253**, 6946.
Meyer, E. F., Jr. (1980) in *Drug Design*, Vol. IX (ed. E. J. Ariens), Academic Press, New York, pp. 267–298.
Ondetti, M. A., Rubin, B. and Cushman, D. W. (1977) *Science*, **196**, 441.
Ozaki, Y., King, R. W. and Carey, P. R. (1981) *Biochemistry*, **20**, 3219.
Patchett, A. A., Harris, E., Tristram, E. W., Wyvratt, M. J., Wu, M. T., Taub, D., Peterson, E. R., Ikeler, T. J., ten Broeke, J., Payne, L. G., Ondeyka, D. L., Thorsett, E. D., Greenlee, W. J., Lohr, N. S., Hoffsommer, R. D., Joshua, H., Ruyle, W. V., Rothrock, J. W., Aster, S. D., Maycock, A. L., Robinson, F. M., Hirschmann, R., Sweet, C. S., Ulm, E. H., Gross, D. M., Vassil, T. C. and Stone, C. A. (1980) *Nature (London)*, **288**, 280.
Peach, M. J. (1977) *Physiol., Rev.*, **57**, 313.
Petrillo, E. W., Jr. and Ondetti, M. A. (1982) *Med. Res. Rev.*, **2**, 1.
Pincus, M. R. and Scheraga, H. A. (1981) *Acc. Chem. Res.*, **14**, 299.
Quiocho, F. A. and Lipscomb, W. N. (1971) *Adv. Protein Chem.*, **25**, 1.
Rando, R. R. (1975) *Acc. Chem. Res.*, **8**, 281.
Rich, D. H. and Sun, E. T. O. (1980) *Biochem. Pharmacol.*, **29**, 2205.
Rich, D. H., Boparai, A. S. and Bernatowicz, M. S. (1982) *Biochem., Biophys. Res. Commun.*, **104**, 1127.
Roberts, G. C. K., Feeney, J., Burgen, A. S. V. and Daluge, S. (1981) *FEBS Lett.*, **131**, 85.
Samuelsson, B., Goldyne, M., Granstrom, E., Hamberg, M., Hammarstrom, S. and Malmsten, C. (1978) *Annu. Rev. Biochem.*, **47**, 997.
Sato, A., Ogiso, A., Noguchi, H., Mitsui, S., Kaneko, I. and Shimada, Y. (1980) *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 1509.
Schroepfer, G. J., Jr. (1981) *Annu. Rev. Biochem.*, **50**, 585.
Schroepfer, G. J., Jr. (1982) *Annu. Rev. Biochem.*, **51**, 555.
Shen, T. Y. (1981) *J. Med. Chem.*, **24**, 1.
Shen, T. Y. and Winter, C. A. (1977) *Adv. Drug Res.*, **12**, 89.
Sheridan, R. P. and Allen, L. C. (1981) *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 1544.
Strominger, J. L. (1970) *Harvey Lect.*, **64**, 179.
Tang, J. (ed.) (1977) *Adv. Exp. Med. Biol.*, **95**, 1–355.
Tipper, D. J. (1979) *Rev. Infect. Dis.*, **1**(1), 39.
Tobert, J. A., Hitzenberger, G., Kukovetz, W. R., Holmes, I. B. and Jones, K. H. (1982) *Atherosclerosis*, **41**, 61.
Tomasz, A. (1979) *Annu. Rev. Microbiol.*, **33**, 113.
Vane, J. R. (1971) *Nature (London), New Biol.*, **231**, 232.
Volz, K. W., Matthews, D. A., Alden, R. A., Freer, S. T., Hansch, C., Kaufman, B. T. and Kraut, J. (1982) *J. Biol. Chem.*, **257**, 2528.
Walsh, C. (1981) *Enzymatic Reaction Mechanisms*, W. H. Freeman and Co., San Francisco, pp. 154–520.
Walsh, C. (1982) *Tetrahedron*, **38**, 871.
Willard, A. K. (1981) *US Patent*, 4,293,496.
Willard, A. K., Novello, F. C., Hoffman, W. F. and Cragoe, E. J. Jr. (1982) *US Patent*, 4,375,475.
Wolfenden, R. (1976) *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, **5**, 271.
Wolfenden, R. (1980) in *Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics*, Vol. 32: *Chemical Recognition in Biology* (ed. F. Chapeville and A.-L. Haenni), Springer Verlag, Berlin, pp. 43–61.

Yocum, R. R., Amanuma, H., O'Brien, T. A., Waxman, D. J. and Strominger, J. L. (1982) *J. Bacteriol.*, **149**, 1150.

第六章

Anderson, R. A. (1981) *Sci. Total Environ.*, **17**, 13.
Banford, J. C., Brown, D. H., McConnell, A. A., McNeil, C. J., Smith, W. E., Hazelton, R. A. and Sturrock, R. D. (1982) *Analyst*, **107**, 195.
Banyard, S. H., Stammers, D. K. and Harrison, P. M. (1978) *Nature (London)*, **271**, 282.
Bertini, I., Luchinat, C. and Scozzafa, A. (1982) *Struct. Bond.*, **48**, **45**.
Birch, N. J. and Sadler, P. J. (1982) in *Specialist Periodical Reports in Inorganic Biochemistry*, Vol. 3 (ed. H. A. O. Hill), Royal Society of Chemists, London, pp. 372–396.
Bremner, I. and Mills, C. F. (1981) *Philos. Trans R. Soc. London, Ser. B*, **294**, 75.
Brewer, G. J., Bereza, U., Kretzchmar, P., Brewer, L. F. and Aster, J. C. (1982) in *Inflammatory Diseases and Copper* (ed. J. R. Sorenson), Humana Press, New Jersey, pp. 532–535.
Brown, D. H. and Smith, W. E. (1980) *Chem. Soc. Rev.*, **9**, 217.
Cantley, L. C. and Aisen, P. (1979) *J. Biol. Chem.*, **254**, 1781.
Colman, P. M., Freeman, H. C., Guss, J. M., Murta, M., Norris, V. A., Ramshaw, J. A. M. and Venkatappa, M. P. (1978) *Nature (London)*, **22**, 319.
Coughlan, M. (ed.) (1980) *Molybdenum and Molybdenum-Containing Enzymes*, Pergamon Press, Oxford.
Cramer, S. P., Gillum, W. O., Hodgson, K. O., Moretensen, L. E., Stiefel, E. I., Chisnel, J. R., Brill, W. J. and Shah, V. K. (1978) *J. Amr. Chem. Soc.*, **100**, **3814**.
Crichton, R. R. (1973) *Struct. Bond.*, **17**, 67.
Dunn, M. F. (1975) *Struct. Bond.*, **23**, 61.
Forth, W. and Rummel, W. (1973) *Physiol. Rev.*, **53**, **724**.
Freeman, H. C. (1967) *Adv. Protein Chem.*, **22**, 257.
Frieden, E. (1980) *CIBA Found.*, **79**, 93.
Harris, E. D., DiSilvestro, R. A. and Balthrop, J. A. (1982) in *Inflammatory Disease and Copper* (ed. J. R. J. Sorenson), Humana Press, New Jersey, pp. 183–199.
Harrison, P. M. and Hoare, R. J. (1980) *Metals in Biochemistry*, Chapman and Hall, London.
Isab, A. A. and Rabenstein, D. L. (1979) *FEBS Lett.*, **106**, 325.
Johnson, F. N. (ed.) (1980) *Handbook of Lithium Therapy*, University Park Press, Baltimore.
Karlish, S. J. D., Beauge, L. and Glynn, I. M. (1979) *Nature (London)*, **282**, 333.
Klotz, I. M., Klippenstein, G. L. and Hendrickson, W. A. (1976) *Science*, **192**, 335.
Lippard, S. J. (ed.) (1983) *Biochemistry of Platinum, Gold and other Therapeutic Agents* (American Chemical Society symposium, no. 209), American Chemical Society, Washington D.C.
MacDonald, L. G., Brown, D. H. and Smith, W. E. (1982) *Inorg. Chim. Acta*, **67**, **7**.
Mareschal, J. C., Rama, R. and Crichton, R. R. (1980) *FEBS Lett.*, **110**, 268.
Michelson, A. M., McCord, J. M. and Fridovich, I. (eds) (1977) *Superoxide and Superoxide Dismutase*, Academic Press, New York.
Peisach, J., Blumberg, W. E., Ogawa, S., Rachmilewitz, E. A. and Oltzik, R. (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 3342.
Racker, E. (1979) *Acc. Chem. Res.*, **12**, 338.
Schwarz, K. and Mertz, W. (1959) *Anal. Biochem. Biophys.*, **85**, 292.

Shaw, C. F. (1979) *Inorg. Persp. Biol. Med.*, **2**, 287.
Sorenson, J. R. J. (ed.) (1982) *Inflammatory Diseases and Copper*, Humana Press, New Jersey.
Sweeney, W. V. and Ranbinowitz, J. C. (1980) *Annu. Rev. Biochem.*, **49**, 139.

Wasserman, R. H. (1977) *Calcium Binding Proteins and Calcium Function*, Elsevier, Amsterdam.
Wood, J. M. and Brown, D. G. (1972) *Struct. Bond.*, **11**, 47.
Woody, R. (1978) in *Biochemical and Clinical Aspects of Haemoglobin Abnormalities*, Academic Press, New York, pp. 279–298.

第七章

Aberhart, J. (1977) *Tetrahedron*, **33**, 1545.
Anastasis, P., Freer, I., Gilmore, C., Mackie, H., Overton, K. and Swanson, S. (1982) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 268.
Arigoni, D. and Eliel, E. L. (1969) *Top. Stereochem*, **4**, 127.
Arnstein, H. R. V. and Morris, D. (1960) *Biochem. J.*, **76**, 357.
Baldwin, J. E., Johnson, B. L., Usher, J. J , Abraham, E. P. Huddleston, J. A. and White, R. L. (1980a) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1271.
Baldwin, J. E., Singh, P. D., Yoshida, M., Sawada, Y. and Demain, A. (1980b) *Biochem. J.*, **186**, 889.
Baldwin, J. E., Keeping, J. W., Singh, P. D. and Vallejo, C. A. (1981) *Biochem. J.*, **194**, 649.
Baltz, R. H. (1978) *J. Gen. Microbiol.*, **107**, 93.
Baltz, R. H. and Seno, E. T. (1981) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **20**, 214.
Baltz, R. H., Seno, E. T., Stonesifer, J., Matsushima, P. and Wild, G. M. (1981) *Microbiology*, 371.
Battersby, A. R. (1967) *Pure Appl. Chem.*, **14**, 117.
Battersby, A. R. (1971) *The Alkaloids*, **1**, 31.
Battersby, A. R. and Gibson, K. H. (1971) *Chem. Commun.*, 902.
Battersby, A. R. and McDonald, E. (1975) in *Falk's Porphyrins and Metalloporphyrins*, 2nd edn (ed. K. M. Smith), Elsevier, Amsterdam, pp. 61–122.
Battersby, A. R., Brown, R. T., Kapil, R. S., Martin, J. A. and Plunkett, A. O. (1966) *Chem. Commun.*, 890.
Battersby, A. R., Kapil, R. S. and Southgate, R. (1968a) *Chem. Commun.*, 131.
Battersby, A. R., Kapil, R. S., Martin, J. A. and Mo, L. (1968b) *Chem. Commun.*, 133.
Battersby, A. R., Burnett, A. R. and Parsons, P. G. (1968c) *Chem. Commun.*, 1282.
Battersby, A. R., Burnett, A. R. and Parsons, P. G. (1969) *J. Chem. Soc.* (*C*) 1193.
Battersby, A. R., Ihara, M., McDonald, E., Satoh, F. and Williams, D. C. (1975) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 436.
Battersby, A. R., McDonald, E., Thompson, M. and Bykovsky, V. Ya. (1978) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 150.
Battersby, A. R., Matcham, G. W. J., McDonald, E., Neier, R., Thompson, M., Woggon, W.-D., Bykovsky, V. Ya. and Morris, H. R. (1979) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 185.
Battersby, A. R., Bushell, M. J., Jones, C., Lewis, N. G. and Pfenninger, A. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 13.
Battersby, A. R., Frobel, K., Hammerschmidt, F. and Jones, C. (1982) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 455.

Blackstock, W. P., Brown, R. T. and Lee, G K. (1971) *Chem. Commun.*, 910.
Bloch, K. (1952) *Harvey Lect.*, **48**, 68.
Bloch, K. and Vance, D. (1977) *Annu. Rev. Biochem.*, **46**, 263.
Bogorad, L. (1966) in *The Chlorophylls* (eds L. P Vernon and G. R. Seeley), Academic Press, New York, pp. 481–510.
Brechbueler-Bader, S., Coscia, C. J., Loew, P., von Szczepanski, Ch. and Arigoni, D. (1968) *Chem. Commun.*, 136.
Brown, S. A. (1972) *Biosynthesis*, **1**, 1.
Burnham, B. F. (1969) in *Metabolic Pathways*, 3rd edn, Vol. III (ed. D. M. Greenberg), Academic Press, New York, pp. 403–537.
Cane, D. E. (1980) *Tetrahedron*, **36**, 1109.
Cane, D. E. (1981) in *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds* (eds J. W. Porter and S. L. Spurgeon), John Wiley, New York, pp. 283–374.
Cane, D. E. and Iyengar, R. (1978) *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 3256.
Cane, D. E. and Iyengar, R. (1979) *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 3385.
Cane, D. E. and Nachbar, R. B. (1978) *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 3208. (corr. **101**, 1908).
Cane, D. E. and Tillman, A. M. (1983) *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 122.
Cane, D. E., Iyengar, R. and Shiao, M.-S. (1978) *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 7122.
Cane, D. E., Liang, T.-C. and Hasler, H. (1981a) *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 5962.
Cane, D. E., Iyengar, R. and Shiao, M.-S. (1981b) *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 914.
Cane, D. E., Swanson, S. and Murthy, P. P. N. (1981c) *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 2136.
Cane, D. E., Rossi, T., Tillman, A. M. and Pachlatko, J. P. (1981d) *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 1838.
Cane, D. E., Liang, T.-C. and Hasler, H. (1982a) *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 7274.
Cane, D. E., Saito, A., Croteau, R., Shaskus, J. and Felton, M. (1982b) *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 5831.
Chater, K. F., Hopwood, D. A., Kieser, T. and Thompson, C. J. (1982) in *Current Topics in Microbiology and Immunology. Gene Cloning in Organisms Other than E. coli*, (eds P. H. Hofschneider and W. Goebel), Springer-Verlag, Berlin, pp. 69–95.
Chayken, S., Law, J., Phillips, A. H., Tchen, T. T. and Bloch, K. (1958) *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **44**, 998.
Clayton, R. B. (1965) *Q. Rev.*, **19**, 168.
Collie, J. N. (1893) *J. Chem. Soc.*, **63**, 329.
Corcoran, J. W. (1981) in *Antibiotics IV. Biosynthesis* (ed. J. W. Corcoran), Springer-Verlag, Berlin, pp. 132–174.
Cornforth, J. W. (1973) *Chem. Soc. Rev.*, **2**, 1.
Croteau, R. (1981) in *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds* (eds J. W. Porter and S. L. Spurgeon), John Wiley, New York, pp. 225–282.
Croteau, R. and Felton, M. (1981) *Arch. Biochem. Biophys.*, **207**, 460.
Croteau, R. and Karp, F. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.*, **184**, 77.
Croteau, R. and Karp, F. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.*, **198**, 512.
Dauner, H. and Mueller, G. (1975) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **356**, 1353.
Deeg, R., Knemler, H.-P., Bergmann, K.-H. and Mueller, G. (1977) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **358**, 339.
DeSilva, K. T., Smith, G. N. and Warren, K. E. H. (1971) *Chem. Commun.*, 905.
Dimroth, P., Ringlemann, E. and Lynen, F. (1976) *Eur. J. Biochem.*, **68**, 581.
Evans, R. and Hanson, J. R. (1976) *J. Chem. Soc., Perkin Trans, 1*, 326.
Fawcett, P. A., Usher, J. J., Huddleston, J. J. and Abraham, E. P. (1976) *Biochem. J.*, **157**, 651.

Gambliel, H. and Croteau, R. (1982) *J. Biol. Chem.*, **257**, 2335.
Gotfredsen, S. E. (1978) *The Biosynthesis of Lagopodine A, B, and C, Coccinol and Linalool*, Dissertation ETH (Zurich), No. 6243.
Gotfredsen, S., Obrecht, J. P. and Arigoni, D. (1977) *Chimia*, **31**,(2), 62.
Hendrickson, J. B. (1959) *Tetrahedron*, 7, 82.
Hofschneider, P. H. and Goebel, W. (eds) (1982) *Current Topics in Microbiology and Immunology. Gene Cloning in Organisms Other than E. coli*, Springer-Verlag, Berlin.
Hopwood, D. A. and Merrick, M. J. (1977) *Bacteriol. Rev.*, **41**, 595.
Ikeda, H., Tanaka, H. and Omura, S. (1982) *J. Antibiot.*, **35**, 507.
Kohsaka, M. and Demain, A. L. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **70**, 465.
Konomi, T., Herchen, S., Baldwin, J. E., Yoshida, M., Hunt, N. A. and Demain, A. L. (1979) *Biochem. J.*, **184**, 427.
Laskovics, F. M. and Poulter, C. D. (1981) *Biochemistry*, **20**, 1893.
Lee, S. L., Hirata, T. and Scott, A. I. (1979) *Tetrahedron Lett.*, 691.
Lewis, N. G., Neier, R., Matcham, G. W. J., McDonald, E. and Battersby, A. R. (1979) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 541.
Loew, P. and Arigoni, D. (1968) *Chem. Commun.*, 137.
Lynen, F., Eggerer, H., Henning, U. and Kessel, I. (1958) *Angew. Chem.*, **70**, 738.
Lynen, F., Agranoff, B. W., Eggerer, H., Henning, U. and Moeslein, E. M. (1959) *Angew. Chem.*, **71**, 657.
Mackie, H. and Overton, K. H. (1977) *Eur. J. Biochem.*, **77**, 101.
Mash, E. A., Gurria, G. M. and Poulter, C. D. (1981) *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 3927.
Meeschaert, B., Adriaens, P. and Eyssen, H. (1980) *J. Antibiot.*, **33**, 722.
Mizukami, H., Nordlov, H., Lee, S.-L. and Scott, A. I. (1979) *Biochemistry*, **18**, 3760.
Mombelli, L., Nussbaumer, C., Weber, H., Mueller, G. and Arigoni, D. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 11.
Mueller, G., Deeg, R., Gneuss, K. D., Gunzer, G. and Kriemler, H.-P. (1979a) in *Vitamin* B_{12} (eds B. Zagalak and W. Friedrich), Walter de Gruyter, Berlin, pp. 279–291.
Mueller, G., Gneuss, K. D., Kriemler, H.-P., Scott, A. I. and Irwin, A. J. (1979b) *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 3655.
Nozoe, S. and Machida, Y. (1972) *Tetrahedron*, **28**, 5105.
Ohfune, Y., Shirahama, H. and Matsumoto, T. (1976) *Tetrahedron Lett.*, 2869
Omura, S. Ikeda, H. and Tanaka, H. (1981) *J. Antibiot.*, **34**, 478.
O'Sullivan, J., Bleaney, R. C., Huddleston, J. A. and Abraham, E. P. (1979) *Biochem. J.*, **184**, 421.
Overton, K. H. and Picken, D. J. (1976) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 105.
Parker, W., Roberts, J. S. and Ramage, R. (1967) *Q. Rev.*, **21**, 331.
Popjak, G. and Cornforth, J. W. (1960) *Adv. Enzymol. Relat. Subj. Biochem.*, **22**, 281.
Popjak, G. and Cornforth, J. W. (1966) *Biochem. J.*, **101**, 553.
Rasetti, V., Pfaltz, A., Kratky, C. and Eschenmoser, A. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 16.
Rueffer, M., Kan-Fan, C., Husson, H.-P., Steockigt, J. and Zenk, M. H. (1979) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1016.
Ruzicka, L. (1959) *Proc. Chem. Soc. (London)*, 341.
Ruzicka, L. (1963) *Pure Appl. Chem.*, 6, 482.
Ruzicka, L. and Stoll, M. (1922) *Helv. Chim. Acta*, **5**, 923.

Samuelsson, B. (1981) *Harvey Lect.*, 75, 1.
Samuelsson, B., Goldyne, M., Granstrom, E., Hamberg, M., Hammarstrom, S. and Malmsten, C. (1978) *Annu. Rev. Biochem.*, 47, 997.
Schleif, R. F. and Favreau, M. A. (1982) *Biochemistry*, 21, 778.
Scott, A. I. (1970) *Acc. Chem. Res.*, 3, 151.
Scott, A. I. (1975) *Tetrahedron*, 31, 2639.
Scott, A. I. and Lee, S.-L. (1975) *J. Am. Chem. Soc.*, 97, 6906.
Scott, A. I. Townsend, C. A., Okada, K., Kajiwara, M. and Cushley, R. J. (1972) *J. Am. Chem. Soc.*, 94, 8269.
Scott, A. I., Yagen, B. and Lee, E. (1973) *J. Am. Chem. Soc.*, 95, 5761.
Scott, A. I., Beadling, L. C., Georgopapadakou, N. M. and Subbarayan, C. R. (1974) *Biorg. Chem.*, 3, 238.
Scott, A. I., Lee, S.-L., de Capite, P., Culver, M. G. and Hutchinson, C. R. (1977) *Heterocycles*, 7, 979.
Scott, A. I., Irwin, A. J., Siegel, L. M. and Shoolery, J. N. (1978) *J. Am. Chem. Soc.*, 100, 316.
Seto, H. and Yonehara, H. (1980) *J. Antibiot.*, 33, 92.
Sinsheimer, R. L. (1977) *Annu. Rev. Biochem.*, 46, 415.
Stephan, K. (1898) *J. Prakt. Chem.*, 58, 109.
Stoeckigt, J. (1978) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1097.
Stoeckigt, J. and Zenk, M. H. (1977) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 646.
Stoeckigt, J., Treimer, J. and Zenk, M. H. (1976) *FEBS Lett.*, 70, 267.
Stoeckigt, J., Hoefle, G. and Pfitzner, A. (1980) *Tetrahedron Lett.*, 21, 1925.
Tamm, Ch. and Breitensein, W. (1980) in *The Biosynthesis of Mycotoxins* (ed. P. S. Steyn), Academic Press, New York, pp. 69–104.
Uzar, H. C. and Battersby, A. R. (1982) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1204.
Volpe, J. J. and Vagelos, P. R. (1973) *Annu. Rev. Biochem.*, 42, 21.
Wang, Y.-G., Davies, J. E. and Hutchinson, C. R. (1982) *J. Antibiot.*, 35, 335.
West, C. A. (1981) in *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds* (eds J. W. Porter and S. L. Spurgeon), John Wiley, New York, pp. 375–411.
Wu, R. (ed.) (1979) *Methods Enzymol.*, 68.

第八章

Abelson, J. and Butz, E. (1980) *Science*, 209, 1317.
Adelstein, R. S. and Eisenberg, E. (1980) *Annu. Rev. Biochem.*, 49, 921.
Amzel, L. M. and Poljak, R. J. (1979) *Annu. Rev. Biochem.*, 48, 961.
Andrews, A. L., Atkinson, D., Barratt, M. D., Finer, E. G., Hauser, H., Henry, R., Leslie, R. B., Owens, N. L., Phillips, M. C. and Robertson, R. N. (1976) *Eur. J. Biochem.*, 64, 549.
Bennett, W. S. and Steitz, T. A. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75, 4848.
Brimacombe, R., Stoeffler, G. and Wittman, H. G. (1978) *Annu. Rev. Biochem.*, 47, 217.
Brock, D. J. H. (1978) in *The Biochemical Genetics of Man* (eds D. J. H. Brock and O. Mayo), Academic Press, London, p. 4.
Champoux, J. J. (1978) *Annu. Rev. Biochem.*, 47, 449.
Chou, P. Y. and Fasman, G. D. (1978) *Annu. Rev. Biochem.*, 47, 251.
Cohn, M. and Reed, G. H. (1982) *Annu. Rev. Biochem.*, 51, 365.
Conti-Tronconi, B. M. and Raftery, M. A. (1982) *Annu. Rev. Biochem.*, 51, 491.
Cross, R. L. (1981) *Annu. Rev. Biochem.*, 50, 681.

Dempsey, C. E. and Vernon, C. A. (1980a) *Annu. Rep. R. Soc. Chem.*, **77**, 340.
Dempsey, C. E. and Vernon, C. A. (1980b) *Annu. Rep. R. Soc. Chem.*, 77, 333.
DePamphilis, M. L. and Wassarman, P. M. (1980) *Annu. Rev. Biochem.*, **49**, 627.
Dickerson, R. E. (1980) *Sci. Am.*, **242**, 98.
Engvall, E. (1980) *Methods Enzymol.*, **70**, 419.
Freifelder, D. (1982) *Physical Biochemistry*, W. H. Freeman, San Francisco.
Gadian, D. G. and Radda, G. K. (1981) *Annu. Rev. Biochem.*, **50**, 69.
Gellert, M. (1981) *Annu. Rev. Biochem.*, **50**, 879.
Goldstein, J. L. (1976) *Methods Enzymol.*, **44**, 397.
Goldstein, J. L. and Brown, M. S. (1977) *Annu. Rev. Biochem.*, **46**, 897.
Gutfreund, H. (1980) *Can. J. Biochem.*, **58**, 1.
Holcenberg, J. S. (1982) *Annu. Rev. Biochem.*, **51**, 795.
Jackson, C. M. and Nemerson, Y. (1980) *Annu. Rev. Biochem.*, **49**, 765.
Kachner, J. F. (1970) in *Fundamentals of Clinical Chemistry* (ed. N. W. Tietz), Saunders, Philadelphia, p. 362.
Klee, C. B., Crouch, T. H. and Richman, P. G. (1980) *Annu. Rev. Biochem.*, **49**, 489.
Kornberg, A. (1980) *Can. J. Biochem.*, **58**, 93.
Lee, A. G. (1981) *Nature (London)*, **294**, 695.
Lewis, P. R. (1975) *Adv. Opt. Electron Microsc.*, 6, 171.
Logan, L. and Cairns, J. (1982) *Nature (London)*, **300**, 103.
Morrison, M. (1980) *Methods Enzymol.*, **70**, 214.
NC-IUB (1982) *Eur. J. Biochem.*, **128**, 281.
Pace, C. N. (1980) *Trends Biochem. Sci.*, **5**, 173.
Pearse, B. M. F. and Bretscher, M. S. (1981) *Annu. Rev. Biochem.*, **50**, 85.
Perutz, M. F. (1979) *Annu. Rev. Biochem.*, **48**, 327.
Pincus, M. R. and Scheraga, H. A. (1981) *Acc. Chem. Res.*, **14**, 299.
Price, N. C. (1979) *Trends Biochem. Sci.*, **4**, N272.
Ptashne, M. Johnson, A. D. and Pabo, C. O. (1982) *Sci. Am.*, **247**, 106.
Reid, B. R. (1981) *Annu. Rev. Biochem.*, **50**, 969.
Reid, K. B. M. and Porter, R. R. (1981) *Annu. Rev. Biochem.*, **50**, 443.
Rossman, M. G. and Argos, P. (1981) *Annu. Rev. Biochem.*, **50**, 497.
Schmidt, E. (1979) *Advances in Clinical Enzymology*, Karger, Basel, p. 2.
Smith, L. C., Pownall, H. J. and Gotto, A. M., Jr. (1978) *Annu. Rev. Biochem.*, **47**, 751.
Sparrow, J. T. and Gotto, A. M., Jr. (1980) *Ann. New York Acad. Sci.*, **348**, 187.
Suckling, C. J., Suckling, K. E. and Suckling, C. W. (1979) *Chemistry through Models*, Cambridge University Press, Cambridge.
Suckling, K. E. and Suckling, C. J. (1980a) *Biological Chemistry*, Cambridge University Press, Cambridge, Chapter 16.
Suckling, K. E. and Suckling, C. J. (1980b) *Biological Chemistry*, Cambridge University Press, Cambridge, Chapter 13.
Timasheff, S. N. and Grisham, L. M. (1980) *Annu. Rev. Biochem.*, **49**, 565.
Steitz, T. A. and Shulman, R. G. (1982) *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, **11**, 419.
Ulmer, K. M. (1983) *Science*, **219**, 666.
Walsh, K. A., Ericsson, L. H., Parmelee, D. C. and Titani, K. (1981) *Annu. Rev. Biochem.*, **50**, 261.
Warshel, A. (1981) *Acc. Chem. Res.*, **14**, 284.
Wikstrom, M., Krab, K. and Saraste, M. (1981) *Annu. Rev. Biochem.*, **50**, 623.
Wilkinson, J. H. (1976) in *The Principles and Practice of Diagnostic Enzymology*, Arnold, London, p. vii.
Wittmann, H. G. (1982) *Annu. Rev. Biochem.*, **51**, 155.
Wool, I. G. (1979) *Annu. Rev. Biochem.*, **48**, 719.
Yelton, D. E. and Scharff, M. D. (1981) *Annu. Rev. Biochem.*, **50**, 657.

索　引

一　画

乙二醛酶　glyoxalase　73

乙酰乙酸脱羧酶　acetoacetate decarboxylase　15

乙酰辅酶 A　acetyl-CoA　203

乙酸激酶　acetate Kinase　80

二　画

二环戊烷并环戊烯　pentalenene　224

二氢三嗪　dihydrotriazine　119

二氢叶酸还原酶　dihydrofolate reductase　117

二氢吡啶　dihydropyridines　40

二氨基嘧啶　diaminopyrimidines　118

儿茶酚胺生物合成和药物　catecholamine biosynthesis and drugs　116

三　画

三拟醇　triparanol　140

三磷酸腺苷 (ATP)　adenosine triphosphate (ATP)　80

工业中的酰基转移酶　acylases in industry　93

己糖激酶　hexokinase　80

马钱苷　loganin　200

四　画

天然产物作为药物　natural products as drugs　117,135

无细胞体系　cell free systems　196

木瓜蛋白酶　papain　113

不对称水合　asymmetric hydration　91

不对称合成　asymmetric synthesis　3

　用醇脱氢酶的　with alcohol dehydrogenases　78,81,86,91

　用吡哆醛模型的用噻唑(鎓)盐的　with thiazolium salts　62

不对称迈克尔加成　asymmetric michael addition　107

不对称还原，用 NADH 模型的　asymmetric reduction with NADH models　48

不对称氢化　asymmetric hydrogenation　13,95

太乐菌素　tylosine　206

长春碱　catharanthine　200

中间体，手性的　intermediates, chiral　91

内酯，手性的　lactones, chiral　85

β-内酰胺抗菌素　β-lactam antibiotics　88,131,198

β-内酰胺酶　β-lactamase　133

化学选择性　chemoselectivity　75

分子内效应　intramolecular effects　21,26

文多林　vindoline　200

计算机辅助分子设计　computer assisted molecular design　128

计算机辅助药物设计　computer aided drug design　152

五　画

丙二酸单酰 CoA　malonyl coenzyme A　203

丙酮酸脱氢酶　pyruvate dehydrogenase　31

丙酮酸脱羧酶　pyruvate decarboxylase　32,63

甲基水杨酸合成酶　methylsalicylate synthase　203

甲巯丙脯酸 captopril 143
电子自旋共振(ESR) electron spin resonance (ESR) 126,172,188
电子转移反应 electron transfer reactions 46,57
电子顺磁共振(EPR) electron paramagnetic resonance (EPR) 126,172,188
电化学还原 electrochemical reduction 81
四氢叶酸 tetrahydrofolate, tetrahydrofolic acid 117
生物化学 biochemistry 228
生物合成 biosynthesis 193
　β-内酰胺 β-lactams 88
　生物碱 alkaloids 194,199
　多酮衍生物 polyketides 203
　类异戊二烯 isoprenoids 209
　肾上腺素 epinephrine 116
　甾体 steroids 138,194
　胆固醇 cholesterol 138
　前列腺素 prostaglandins 125
　生物体系中的钒 Vanadium in biological systems 174
生物体系中的钙 calcium in biological systems 180
生物体系中的钴 cobalt in biological systems 176
生物体系中的钼 molybdenum in biological systems 179
生物体系中的铁 iron in biological systems 163
生物体系中的主族金属离子 main group metal ions in biological systems 180
生物体系中的铬 chromium in biological systems 175
生物体系中的过渡金属离子 transifion metal ions in biological system 163
生物体系中的锂 lithium in biological systems 185
生物体系中的锌 zinc in biological systems 178
生物体系中的锰 manganese in biological systems 178
生物素 biotin 27
用酶拆分 resolution with enzymes 92
主-客体化学 host-guest chemistry 37,47,105
加氧酶模型 oxygenases models 57,59
立方区划模型 cubic section model 86
立体电子效应 stereoelectronic effects 14,129
立体位阻与选择性 steric hindrance and selectivity 97
立体选择性 stereoselectivity 3,13,48,75,120,130,214
对映体选择性反应 enantioselective reactions 17,81,106
发酵 fermentation 1
丝氨酸羟甲基转移酶 serine hydroxymethyl transferase 118

六　画

有效摩尔浓度 effective molarity 21
机理,一般讨论 mechanism, general discussion 9
机理与药物设计 mechanism and drug design 115,154
机理与酶 mechanism and enzymes 8
机理研究中的动力学 kinetics in mechanistic studies 10,150,241
过氧化物酶 peroxidase 112
过渡态 transition states 11
过渡态类似体 transition state analogues 29,133,155
曲古二烯 trichodiene 217
同位素标记 isotopic labels
　[^{13}C] 88
　[^{14}C] 213,218,225
　[^{2}H] 213
　[^{3}H] 213,218,225

[^{18}O] 216,222,224
[^{32}P] 223
与乙酰乙酸脱羧酶 and acetoacetate decarboxylase 15,17
与羧肽酶 A and carboxypeptidase A 12
手性的 chiral 79,81,88,213,219
虫荧光素酶，模型 luciferase, models of 59
血压 blood pressure 143
血红蛋白 haemoglobin 165
血浆铜蓝蛋白， caeruloplasmin 161,164,169
血蓝蛋虫 haemocyanin 169
血管紧张肽 angiotensin 5
血管紧张肽转化酶 angiotensin converting enzyme 143
仿生化学 biomimetic chemistry 34,99
仿生杂化体系 biomimetic hybrid systems 113
合成 synthesis 3,13,79
用酶的 with enzymes 4,76
合成设计中的逻辑 logic in synthetic planning 83
肌钙蛋白 tropoline 181
肌集钙蛋白 calsequestrin 181
多巴 (DOPA) dopa 116
多巴胺 dopamine 116
多巴胺 β-羟化酶 116
dopamine β-hydroxylase 116
多酮衍生物，生物合成 polyketides, biosynthesis 194,203
并环戊二烯 pentalenene 225
冰片基焦磷酸酯 bornyl pyrophosphate 221
异丁苯丙酸(布洛芬) ibuprofen 124
异戊二烯规则 isoprene rule 210
红霉素生物合成 erythromycin biosynthesis 205

七 画

苄醇，手性 benzyl alcohol, chiral 79,81
花生四烯酸 arachidonic acid 125
还原 reduction
不对称 asymmetric 13,48,88,91,95
用 NADH 模型 by NADH models 40
用脱氢酶 by dehydrogenases 31,78,81,91,117
用噻唑鎓盐 by thiazolium salts 66
电化学 electrochemical 81
抗体，单克隆 antibodies, monoclonal 237
抗炎剂 antiinflammatory agents 123
抗菌素，生物合成 antibiotics, biosynthesis 88,198,203
抑制剂，不可逆 inhibitors, irreversible 135
抑制剂，过渡态类似物 inhibitors, transition state analogues 30
抑制剂与药物 inhibitors and drugs 116
吡啶鎓盐 pyridinium salts 40
吲哚生物碱，生物合成 indole alkaloids, biosynthesis 209
位置选择性 regioselectivity 75,101
阿司匹林 aspirin 124
谷胱甘肽 glutathione 71,184,187

八 画

环氧化，位置选择性 epoxidation, regioselective 104
环氧合酶 cyclooxygenase
环糊精 cyclodextrins 35, 47, 67, 100,105
环橙花二醇 cyclonerolidol 212
青霉素 penicillins
生物活性 bioactivity of 131
生物合成 biosynthesis 87,198
青霉胃蛋白酶 penicillopepsin 149
表面活性剂，官能化的 surfactants,

functionalized 62,110
构象，酶底物的 conformation of enzyme substrates 16, 121, 126, 133
构象与选择性 conformation and selectivity 13
苯丙氨酸羟化酶 phenylalanine hydroxylase 116
苯基乙醇胺 N-甲基转移酶 phenylethanolamine N-methyl transferase 116
转肽酶 transpeptidases 134
转氨(基)作用 transamination 67
软和硬离子 hard and soft ions 161
肾上腺素 epinephrine 116
非酶蛋白质 nonenzymic proteins 232
固定化酶 immobilized enzymes 82,90
固氮 nitrogen fixation 180
固氮酶 nitrogenases 180
物种特异性药物 species-specific drugs 120
质子，催化作用 proton, catalysis by 43
质子转移 proton transfer 22
质体青 plastocyanin 171
乳酸脱氢酶 lactate dehydrogenase 43,78
细菌，细胞壁 bacteria, cell wall of 131
金刚石晶格模型 diamond lattice model 86
金络合物用为药物 gold complexes as drugs 182
金诺芬 auranofin 183
金属离子 metal ions
  生物体系中的 in biological systems127,144,158
  作为药物 as drugs 182
  普通化学 general chemistry 158
  催化中的 in catalysis 42,54,69,127,145
金属离子输运 transport of metal ions 159,161,163
金属硫因 metallothionein 170
金硫葡糖 solganol 182
底物去稳化 substrate destabilization 155
底物结合 substrate binding 25, 28,32,120,138,147
疟疾 malaria 118
沸石 zeolites 113
官能团修饰 functional group modification 95
甾体 steroids
  抗炎剂 anti-immflamatory 123
  选择性取代 selective substitution in 103
免疫测定 immunoassays 237

九　画

药物动力学与金属离子 pharmacokinetics and metal ions 190
药物设计 drug design 115,182
研究金属蛋白的物理方法 physical methods for studying metalloproteins 186
临床分析 clinical analysis 233
钙调蛋白 calmodulin 181,230
类风湿性关节炎 rheumatoid arthritis 124,173,183
选择性 Selectivity
  仿生的 biomimetic 100
  共价控制 covalent control of 102
氢过氧化 hydroperoxylation 124
胆固醇生物合成 cholesterol biosynthesis 138
胆固醇氧化酶 cholesterol oxidase 236
胃酶抑素(抑肽素) pepstatin 150
前列腺素 prostaglandins
  生物合成 biosynthesis 129
  生物活性 biological activity 124
  合成 synthesis 93,95

烃化,位置选择性 alkylation, regioselectiv 106,113
活性位点模型 active site models 84
冠醚 crown ethers 47,100,106

十 画

核磁共振 (NMR) nuclear magnetic resonance 110,187, 196, 208,213, 243
用于生物合成研究 in biosynthetic studies 193
配分函数 partition functions 19
莫能菌素 monensin 204
速度控制步骤 rate determining step 11
原子吸收光谱 atomic absorption spectroscopy 190
圆二色性 circular dichroism 187
铁传递蛋白 transferrin 164
铁氧还蛋白 ferredoxin 167
铁蛋白 ferritin 163
铁硫蛋白 iron sulphur proteins 163
氧化 oxidation
用黄素蛋白模型 by flavoprotein models 52
用烟酰胺辅酶模型 by nicotinamide coenzyme models 50
用脱氢酶 by dehydrogenases 78,87
立体选择性 stereoselective 86
花生四烯酸的 of arachidonic acid 125
氨甲蝶呤 methotrexate 121
结合到二氢叶酸还原酶 binding to dihydrofolate reductase 120
氨基酸氧化酶 amino acid oxidase 56
胺类,位置选择性酰化 amines, regioselective acylation 107
胰岛素与铬离子 insulin and chromium ion 175
胰蛋白酶 chymotripsin 83,94
胸苷酸合成酶 thymidylate synthase 118
脂氧合酶 lipoxygenase 125,129
脂蛋白 lipoproteins 233
胶束 micelles 45,55,64,109, 112
高分子与固定化酶 polymers and immobilized enzymes 82
高分子负载的试剂 polymer-supported reagents 62
高血压 hypertension 144
消炎痛 indomethacin 124
烟酰辅酶 nicotinamide coenzymes
再生 regeneration 78
模型 models 40

十一 画

萜烯,生物合成 terpenes, biosynthesis 194
萝芙辛 ajmalicine 200
黄素 flavins 52,79,113
辅酶 coenzymes
与酶的结合 binding to enzymes 32
再生 regeneration 78
类似物 analogues 39
辅酶化学 chemistry 39
铝酸酯,手性的 aluminates, chiral 98
脱氢酶 dehydrogenase 78, 80, 81, 86,91,117,139
脱氮黄酶 deazaflavins 51
蛋白质生物化学 protein biochemistry 229
蛋白质合成 protein synthesis 234, 244
维生素 B_1 vitamin B_1 61
维生素 B_6 vitamin B_6 65
维生素 B_{12},生物合成 vitamin B_{12}, 177 biosynthesis 196
维生素 E vitamin E 84
蚯蚓血红蛋白 haemerythrin 167
蛇麻烯 humulene 224
烯丙基焦磷酸酯类 allylic pyrophosphates 209

烯类 alkenes
不对称水合 asymmetric hydration
不对称还原 91
asymmetric reduction 13
烯醇化物还原酶 enolate reductase
羟化酶 hydroxylases 112
羟基-甲基戊二酸单酰 CoA 还原酶 hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase 139

十二 画

联萘 binaphthyl 97
棒曲酸 clavulanic acid 135
葡糖苷酶 glucosidases 2
葡糖-6-磷酸脱氢酶 glucose-6-phosphate dehydrogenase 80
超氧化物歧化酶 superoxide dismutase 170,178
硫代苹果酸金钠 myocrisin 183
硫辛酸 lipoic acid 71
硫胺素焦磷酸 thiamine pyrophosphate 17,31,33,61
硫醇辅酶 thiol coenzymes 71
拉曼光谱法 raman spectroscopy 187
遗传工程 genetic engineering 209
β-氰醇化酶 β-hydroxynitrilolase 92
氯化，位置选择性 chlorination, regioselective 103,109,111
氯过氧化物酶 chloroperoxidase 111
氯胍 proguanil 119
锁钥假说 lock and key hypothesis 2
富马酸酶 fumarase 92

十三 画

酮类，不对称还原 ketones, asymmetric reduction 97
酰化，位置选择性 acylation, regioselective 107
酰胺水解，催化 amide hydrolysis, catalysis of 28
酰基转移 acyl transfer
酰基转移酶，猪肾 acylase, hog kidney 93
酪氨酸羟化酶 tyrosine hydroxylase 116
凝乳酶 renin 144
硼氢化物，手性的 borohydrides, chiral 97
羧肽酶 carboxypeptidases 136
羧肽酶A carboxypeptidase A 12,148,179
催化 catalysis
分子内 intramolecular 21,26
非共价 noncovalent 45
金属离子 metal ion 42,54,68,158
胶束 by micelles 46,55,64,67
概念 concepts 9
酶，机理 enzyme mechanism 8
酸碱 acid/base 22,43
熵 entropy 18
微生物用于合成 microorganisms in synthesis 76,80,83,94
微观可逆性 microscopic reversibility 11
缝籽木嗪 geissoschizine 202
疏水效应 hydrophobic effects 64

十四 画

模板反应 template reactions 101
模型，基于计算机的 models, computer-based 128,152
模型，活性位点的 models for active sites 86
模型，辅酶的 models for coenzymes 40
模型体系 model systems 34
酵母，用于合成 yeast, in synthesis
酶 enzymes
手性与酶 chirality and 2,75,120,130
化学本性 chemical nature of 1

分子内反应与酶 intramolecular reactions and 21
用于旋光拆分 in optical resolution 93
机理和催化 mechanism and catalysis 8
合成中的酶 in synthesis 4,76
进化与酶 evolution and 24, 155
抑制 inhibition of 16,115
作为生物学工具 as biological tools 235
固定化 immobilized 81
底物结合 substrate binding 20,155
效率 efficiency of 24
模型体系 model systems for 34
精制 purification 3,208
酸碱催化 acid/base catalysis in 22
熵与酶 entropy and 18
酶的选择性,在合成中 selecfivity of enzymes in synthesis 76
酶催化反应的立体化学 stereochemistry of enzyme catalyzed reactions 76,120,130
酸性蛋白酶 acid proteases 148
酸碱催化 acid/base catalysis 22, 43
碳酸酐酶 carbonic anhydrase 179
稳态 steady state 10
膜 membrances 240

十五 画

醇类，手性的 alcohols, chiral 48, 78,81
熵的分子基础 entropy, molecular basis of 18
[^{13}C]-缬氨酸 [^{13}C]-valine 88

十六 画

橙花叔醇 nerolidol 212
醛类，不对称还原 aldehydes, asymmetric reduction of 48,78,81
噻吩霉素 thienamycin 131
噻唑鎓盐 thiazolium salts 17,34, 56,61
凝血 blood clotting 126
血管紧张肽原酶 renin 144

十七 画

磷酸吡哆醛 pyridoxal phosphate 15,66

其 它

Arnstein 三肽 Arnstein tripeptide 199
Cutin-hammett 原理
Cutin-Hammett principle 12
Diels-Alder 反应 Diels-Alder reaction 106
DNA 重组 DNA, recombinant 205,244
DNA 合成的抑制 DNA synthesis, inhibition of 117
ELISA 238
EMIT 237
EXAFS 165,180,186
Fischer, E. 2
Grandisol 合成
Grandisol synthesis 93
Liebig, J. von 1
Mevinolin 141
Monobactam 131
Pasteur, I. 1
Sackur-Tetrode 方程式
Sackur-Tetrode equation 19
Strictosidine 201
Wöhler, F. 1
X 射线结晶学 X-ray crystallography 121,138,149

中科院植物所图书馆
S0014761

收到期 1992.5.13.
来 源 西单新华书店
书 价 9.90
单据号 0132392
开票日期 92.5.13.

25851

酶化学影响…

1991年

借者单位	借者姓名

58.17435
794

注

1 借书到期请即…
2 请勿在书上批…
折角。
3 借去图书如有…
等情形须照…

2585…

京卡 0701

ISBN 7-03-002466-4
O·460

定　价：9.90 元

科技新书目：255-084